
Aspekte des wirtschaftlichen und effizienten Einsatzes der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig



zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
Dissertation

von Lukas Michael Kaminski
aus Breslau / Polen

1. Referent:	Professor Dr. Hermann Wätzig
2. Referent:	apl. Professor Dr. Ulrich Engelhardt
eingereicht am:	03.08.2011
mündliche Prüfung (Disputation) am:	11.11.2011
Druckjahr	2011

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor dieser Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

1. L. Kaminski, S. El Deeb, H. Wätzig, *Repeatability of monolithic HPLC columns while using a flow program*, Journal of Separation Science, 31 (10) 1745 – 1749 (2008).
2. L. Kaminski et al, *Efficient and economical HPLC performance qualification*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 51 (3), 557 – 564 (2010)
3. L. Kaminski, H. Wätzig, *Efficient and economical HPLC performance Qualification*, Consensus paper of the Working Group Drug Quality Control / Pharmaceutical Analytics of the German Pharmaceutical Society (DPhG), in collaboration with the Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik (APV; engl: International Association for Pharmaceutical Technology) (Internet: <http://www.pharmchem.tu-bs.de/forschung/waetzig/dphg/>)
4. L. Kaminski, U. Schepers, H. Wätzig, *Analytical method transfer using equivalence tests with reasonable acceptance criteria and appropriate effort: Extension of the ISPE concept*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 53 (5), 1124 – 1129 (2010)
5. L. Kaminski, B. McDowell, et al., *Why System Suitability Tests Are Not a Substitute for Analytical Instrument Qualification (Part 3): Performance Qualification*, LC-GC Europe Volume 24, August 2011

Tagungsbeiträge

1. L. Kaminski, S. El Deeb, H. Wätzig, *Evaluation of repeatability on monolithic HPLC columns when a flow program is applied*, (Poster) Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (DPhG) 2007 in Erlangen.
2. S. Redweik, F. Würch, L. Kaminski, H. Wätzig, *HPLC instrument qualification: Evaluation of guidelines and essential parameters*, (Poster) Symposium der Fachgruppe für Arzneimittelkontrolle und Pharmazeutische Analytik 2007 in Erlangen.
3. L. Kaminski, H. Wätzig, *Efficient and economical HPLC performance Qualification part 1*, (Poster) 19th International Symposium on Pharmaceutical & Biomedical Analysis (PBA 2008) 2008 in Gdansk (Polen).
4. L. Kaminski, H. Wätzig, *Efficient and economical HPLC performance Qualification part 2*, (Poster) Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (DPhG) 2008 in Bonn.

-
5. L. Kaminski, H. Wätzig, *Efficient and economical HPLC performance Qualification part 3*, (Poster) 34th International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (HPLC 2009) 2009 in Dresden.
 6. L. Kaminski, H. Wätzig, *Gerätequalifizierung – wirtschaftlich und leistungsfähig am Beispiel der HPLC*, (Vortrag) Symposium der Fachgruppe für Arzneimittelkontrolle und Pharmazeutische Analytik 2009 in Jena.
 7. L. Kaminski, S. Grotefend, H. Wätzig, *Quantitation of proteins using High Performance Size exclusion and Strong Anion Exchange Chromatography*, (Poster) International Symposium on Drug Analysis 2010 in Antwerpen (Belgien)
 8. L. Kaminski, S. Grotefend, H. Wätzig, *High Performance Size exclusion and Strong Anion Exchange Chromatography for proteins assays*, (Poster) Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (DPhG) 2010 in Braunschweig.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Pharmazeutische Chemie der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Hermann Wätzig, dem ich an dieser Stelle ganz herzlich für die freundliche Aufnahme in den Arbeitskreis, die Möglichkeit zum selbstständigen Arbeiten, seine uneingeschränkte Unterstützung und für das zu allen Zeiten entgegengebrachte Vertrauen danken möchte.

Besonders möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Ulrich Engelhardt für die Übernahme des Korreferats bedanken.

Ich möchte mich an dieser Stelle auch bei allen Mitarbeitern des Instituts für Pharmazeutische Chemie bedanken. Im Speziellen gilt mein Dank meinen Arbeitskreiskollegen Xi Deng, Claudia Cianciulli, Sabine Redweik, Sandra Grotefend, Sascha Kühne, Thomas Hahne und Tobias Rakow, sowie meinen ehemaligen Kollegen Dr. Simone Schröder, Dr. Adhitasari Suratman, Dr. Sami El Deeb und Dr. Phillip Hasemann für die tolle Zusammenarbeit, fachliche Unterstützung und für die angeregten Diskussionen. Besonders bei Sabine Redweik, Friedericke Würch, Sandra Grotefend, Thomas Hahne, Sophie Löffler und Tobias Rakow, die als Studierende im Rahmen ihrer Wahlpflichtfacharbeiten einen großen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet haben, möchte ich mich ganz herzlich bedanken.

Dr. Hans-Otto Burmeister, Stephanie Ludewig, Birthe Strasdat, Janina Nolte, Sandra Grotefend, Thomas Hahne, Petra Reich und Brigitte Babic danke ich sehr für den kollegialen Umgang bei der Betreuung des vierten Semesters, sowie für die sehr interessanten, fachlichen Gespräche in Raum 161.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei allen Kooperationspartnern des PQ-Projektes bedanken, die mit ihren Daten das Projekt erst ermöglicht haben.

Abschließend gebührt ein großer Dank meiner Familie. Von ganzem Herzen danke ich meiner Ehefrau für ihre unerschöpfliche Geduld und den Rückhalt, den sie mir bei der Anfertigung dieser Arbeit bot. Auch meinen Eltern, die mich auf meinem

Lebensweg stets unterstützt haben, danke ich vielmals. Besonders meiner Mutter danke ich für die fortwährende Ermutigung zu dem Schritt die Promotion zu beginnen.

Daphny und Jan

gewidmet

*„Große Männer streben keine Macht an,
die Macht wird ihnen aufgedrängt!“*

frei nach William Shakespeare

Abkürzungen

AAPS – American Association of Pharmaceutical Scientists

AFFFF – Asymmetrische Fluss Feld-Fluss Fraktionierung

AIQ – Analytical Instrument Qualification

AL – Acceptance Limit

API – Active Pharmaceutical Ingredient

APV – Arbeitsgemeinschaft für pharmazeutische Verfahrenstechnik

AUC – Area Under the Curve

CE-MS – Capillary Electrophoresis – Mass Spectrometry

CFR – Code of Federal Regulations

COTS – Commercial Of The shelf System

DAD – Diode Array Detector

DPhG – Deutsche Pharmazeutische Gesellschaft

DQ – Design Qualification

FDA – Food and Drug Administration

GFC – Gelfiltrationschromatographie

GPC – Gelpermeationschromatographie

HETP – Height Equivalent to a Theoretical Plate

HPB – Health Protection Bureau

HPLC – High Performance Liquid Chromatography

HP-SEC – High Performance Size Exclusion Chromatography (= SE-HPLC)

ICH – International Conference on Harmonisation (of Technical Requirements for
Registration of Pharmaceuticals for Human Use)

iTRAQ – Isobaric tags for relative and absolute quantification

IEP – Isoelektrischer Punkt (= *pI*)

IQ – Installation Qualification

ISPE – International Society of Pharmaceutical Engineering

kDa – Kilodalton

LC-MS – Liquid Chromatography-Mass Spectrometry

LOD – Limit of Detection

LOQ – Limit of Quantification

MCA – Medical Control Agency

MS – Mass Spectrometry

nSEC – Non Ideal Size Exclusion Chromatography

OOS – Out Of Specification

OQ – Operational Qualification

PEEK – Polyetheretherketon

PQ – Performance Qualification

RP-Phase – Reversed Phase

RSD% – Relative Standard Deviation [%]

S/N – Signal to Noise

SEC – Size Exclusion Chromatography

SE-HPLC – Size Exclusion High Performance Liquid Chromatography (= HP-SEC)

SST – System Suitability Test

TAP – Transfer of Analytical Procedures

t_R – Retentionszeit

UHPLC – Ultra High Performance Liquid Chromatography

USP – United States Pharmacopia

USR – User Requirement Specifications

UV/VIS – Ultra Violett / Visible

VSER – Vendor Specified Environmental Requirements

Inhaltsverzeichnis

Vorveröffentlichungen der Dissertation	i
Danksagung	iii
Abkürzungen.....	vii
Inhaltsverzeichnis	ix
1. Einleitung und Aufgabenstellung.....	1
2. Theoretische Grundlagen	6
2.1. High Pressure oder High Performance?	6
2.2. Aufbau einer HPLC Anlage	6
2.2.1. Vorratsgefäß für das Elutionsmittel (= mobile Phase)	6
2.2.2. Pumpe und Gradientenmischer	7
2.2.3. Injektor / Autosampler.....	8
2.2.4. Trennsäule.....	9
2.2.4.1. Normalphasenchromatographie	9
2.2.4.2. Umkehrphasenchromatographie (engl. Reversed Phase = RP)	10
2.2.4.3. Größenausschlußchromatographie	11
2.2.5. Detektor	11
2.2.5.1. UV/VIS und DA-Detektor	11
2.2.5.2. Andere Detektoren	12
2.2.5.3. Rauschen	13
2.2.5.4. Drift.....	13
2.2.6. Auswertesystem	13
2.3. Chromatographische Parameter	14
2.3.1. Kapazitäts- und Selektivitätsfaktor.....	14
2.3.2. Trennleistung.....	15
2.3.3. Auflösung	17
2.3.4. Signal zu Rausch – Verhältnis.....	18
2.4. Validierungsparameter nach ICH Q2	19
2.4.1. Nachweis- und Bestimmungsgrenze	19
2.4.2. Richtigkeit.....	20
2.4.3. Präzision.....	21

2.4.4. Robustheit	23
3. Die schnelle HPLC	24
3.1. UHPLC	25
3.2. Fused-core Partikel	27
3.3. Monolithische Säulen	28
3.3.1. Das Flussratenprogramm (= Flussprogramm)	30
3.3.2. Einfluss des Flussratenprogramms auf die Präzision	31
3.3.2.1. Methode und Durchführung der Testung	32
3.3.2.2. Ergebnisse der Testung	34
3.3.2.3. Bewertung und Interpretation der Ergebnisse	35
3.4. Zusammenfassung	38
4. Qualifizierung Analytischer Instrumente	40
4.1. Notwendigkeit der Qualifizierung	40
4.2. Begriffe und Definitionen nach USP <1058>	41
4.2.1. Kategorien von analytischen Instrumenten	42
4.2.2. Gliederung der AIQ – Das 4Q Konzept	43
4.2.2.1. Entwurfsqualifizierung (Design Qualification = DQ)	43
4.2.2.2. Installationsqualifizierung (Installation Qualification = IQ)	44
4.2.2.3. Funktionsqualifizierung (Operational Qualification = OQ)	44
4.2.2.4. Leistungsqualifizierung (Performance Qualification = PQ)	45
4.3. Schwächen der klassischen AIQ nach <1058>	45
4.3.1. Schwächen im Hinblick auf die Datenqualität	46
4.3.2. Schwächen aus wirtschaftlicher Sicht	47
4.4. Die kontinuierliche PQ – Ein innovatives Konzept	48
4.4.1. Parameterlisten für die HPLC Qualifizierung	49
4.4.2. Optimierung der Parameterlisten für die HPLC-Qualifizierung	52
4.4.2.1. Weggelassene oder zusammengeführte Parameter	52
4.4.2.2. Holistische OQ/PQ - Direkt bestimmbare Parameter	57
4.4.2.3. Holistische OQ/PQ – Über RSD% bestimmbare Parameter	69
4.4.2.4. Der Systemeignungstest (System Suitability Test = SST)	71
4.4.3. SST vs. PQ: Ist die Datenqualität gleichwertig?	73
4.4.3.1. Der F-Test	74

4.4.3.2. Das Pilotprojekt	75
4.4.3.3. Ausweitung des Projekts auf Daten von Kooperationspartnern.....	79
4.4.3.4. Kontrollkarten in der PQ	81
4.5. Zusammenfassung.....	84
4.5.1. OQ + PQ + SST = Das Beste aus drei Welten	84
4.5.2. Möglichkeiten und Grenzen der kontinuierlichen PQ	85
4.5.2.1. Was tun, wenn ein SST für die kontinuierliche PQ ungeeignet ist?	86
4.5.2.2. Implementierung im Laboralltag	86
5. Quantitative Größenausschlusschromatographie.....	88
5.1. Grundlagen der Größenausschlusschromatographie.....	88
5.1.1. Chromatographische Parameter in der SEC	90
5.2. Einsatz der SEC in der Pharmazeutischen Analytik.....	92
5.2.1. Auswahl geeigneter chromatographischer Bedingungen	92
5.2.1.1. Modifizierung der Ionenstärke	93
5.2.2. Molmassenbestimmung am Beispiel eines Polycysteins.....	94
5.3. Quantitative SEC.....	96
5.3.1. Präzision in der GFC	97
5.3.1.1. Präzision des Elutionsvolumens (V_e)	97
5.3.1.2. Präzision der Peakflächen (AUC)	99
5.3.1.3. Auswahl der Detektionswellenlänge und ihr Einfluss auf die LOQ	101
5.3.2. Problematik der Trennung von Proteinen	103
5.3.2.1. Quantifizierung nicht vollständig aufgelöster Peaks	104
5.3.3. Die nicht-ideale SEC: unerwünscht! Oder doch nicht?	106
5.3.3.1. Entwicklung einer nSEC Methode	106
5.3.3.2. Präzision und Linearität der Peakflächen in der nSEC	109
5.4. Zusammenfassung.....	112
6. Transfer Analytischer Methoden.....	114
6.1. Warum kein t-Test?	115
6.1.1. Das Konzept eines Äquivalenztests	117
6.1.2. Vorteile gegenüber dem Zwei-Stichproben t-Test	119
6.2. Das ISPE-Konzept: Möglichkeiten und Grenzen.....	121
6.3. Das erweiterte ISPE-Konzept	122

6.3.1. Aufgeweitete Akzeptanzgrenzen und der Skalierungsfaktor	122
6.3.2. Prozentuale Akzeptanzgrenzen (%AL)	123
6.3.3. Anwendung der %AL im erweiterten ISPE Konzept	124
6.3.4. Anwendung des erweiterten ISPE-Konzepts	125
6.4. Zusammenfassung	125
7. Zusammenfassung der Arbeit	127
8. Experimenteller Teil	132
8.1. Instrumentierung und Software	132
8.1.1. verwendete HPLC-Säulen	133
8.1.1.1. schnelle HPLC und AIQ	133
8.1.1.2. SEC und nSEC	133
8.2. Flussratenprogramm in der schnellen HPLC	134
8.2.1. Chemikalien und Reagenzien	134
8.2.2. Chromatographische Bedingungen	135
8.2.3. Lösungsmittel für die Proben	135
8.2.4. Probenvorbereitung	135
8.3. AIQ	135
8.3.1. Chemikalien und Reagenzien	135
8.3.1.1. PQ-Methode	136
8.3.1.2. Routinemethode	136
8.3.2. Chromatographische Bedingungen	136
8.3.2.1. PQ-Methode	136
8.3.2.2. Routinemethode	136
8.3.3. Lösungsmittel für die Proben	137
8.3.4. Probenvorbereitung	137
8.3.4.1. PQ-Methode	137
8.3.4.2. Routinemethode	137
8.3.5. Standards zur Bestimmung der Detektorlinearität	137
8.3.6. Daten von Kooperationspartnern	137
8.4. Quantitative SEC	137
8.4.1. Chemikalien und Reagenzien	137
8.4.2. Chromatographische Bedingungen	138

8.4.2.1. SEC-Experimente	138
8.4.2.2. nSEC-Experimente	139
8.4.3. Lösungsmittel für die Proben	139
8.4.4. Probenvorbereitung	139
8.4.4.1. SEC-Experimente	139
8.4.4.2. nSEC-Experimente	140
9. Literatur	141
10. Lebenslauf	151

1. Einleitung und Aufgabenstellung

Die Chromatographie (zu Deutsch: Farbenzeichnen) fand zum ersten Mal 1903 Erwähnung in der Welt der Wissenschaft, als der russische Botaniker Michail Semjonowitsch Tswett seine ersten Arbeiten über die „Adsorptionsphänomene und deren Anwendung für die biochemische Analyse“ [1] veröffentlichte. Er selbst beschreibt in dieser Arbeit seine Beobachtungen so:

"Zuerst fließt eine farblose, dann eine gelbe Flüssigkeit aus dem unteren Ende der Röhre, und in den oberen Schichten einer Inulinsäule formt sich ein grüner Ring, unter dem ein gelber Rand erscheint. Bei der Fortsetzung des Experimentes verbreitern sich beide Ringe, grün und gelb, beträchtlich und dehnen sich nach unten aus. Es zeigt sich die Möglichkeit, eine neue Methode der physikalischen Trennung verschiedener Substanzen zu entwickeln, die in organischen Flüssigkeiten gelöst sind. Die Methode basiert auf der Fähigkeit der gelösten Stoffe, physikalische Adsorptionsverbindungen mit verschiedenen mineralischen und festen Körpern einzugeben."
(<http://www.uft.uni-bremen.de/chemie/Chromatography/chromhis.htm>)

Seit diesen Tagen sind über 100 Jahre vergangen und obwohl sich auf dem Gebiet der Chromatographie viel getan hat, besitzen Tswetts Grundlagen nach wie vor Gültigkeit.

1952 bekamen die beiden Biochemiker Archer Martin und Richard Synge, für die Entwicklung der Verteilungschromatographie, den Nobelpreis für Chemie [2]. Damit war ein großer Schritt hin zu der uns heute bekannten Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. High Performance Liquid Chromatography – HPLC) getan. Es sollte jedoch bis in die 1970er Jahre dauern bis geeignete Geräte und vor allem Partikel für die Säulenfüllung, die klein genug waren (ca. 10µm), zur Verfügung standen und die HPLC überhaupt praktisch umsetzbar wurde. Ihren endgültigen Siegeszug trat die HPLC aber erst mit der Einführung der Umkehrphasen (RP – Phasen) an, da diese vielseitiger einsetzbar waren und die Lösung von komplizierten analytischen Fragestellungen ermöglichten.

Heute ist die HPLC eine der wichtigsten instrumentellen Methoden für qualitative und quantitative Analytik überhaupt und aus der analytischen Chemie nicht mehr

wegzudenken [3]. Die Grenzen dieser Technik sind aber bei weitem noch nicht erreicht. Es werden weiterhin neue Geräte und neue Trennsäulen für den Einsatz in der seit einiger Zeit immer populär werdenden „schnellen HPLC“ entwickelt. In diesem Feld rivalisieren zwei unterschiedliche Ansätze. Die Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC), die mit speziellen neuen Geräten und kurzen, mit sehr kleinen Partikeln ($< 2\mu\text{m}$) gepackten, Säulen sehr hohe Effizienz erreicht, konkurriert mit monolithischen Säulen, welche nicht gepackt sind, sondern in einem speziellen Sol-Gel-Verfahren hergestellt werden und hohe Effizienz bei sehr hohen Fließgeschwindigkeiten erlauben. Beide Techniken können die Analysenzeiten gegenüber klassischer HPLC um bis zu 90% verkürzen [4] was die Analysenkosten erheblich verringert. Vor allem monolithische Säulen sind unter dem Kostenaspekt sehr interessant, da sie mit herkömmlichem HPLC-Equipment auskommen.

Üblicherweise wird in der HPLC der Fluss der mobilen Phase konstant bei einer optimalen Flussrate u_o gehalten, um eine möglichst hohe Trennleistung zu gewährleisten (siehe Abschnitt 2.3.2.). Da die monolithischen Säulen auch bei hohen Flussraten keine nennenswerten Einbußen an Trennleistung zeigen, bietet sich hier der Einsatz eines Flussprogramms, dessen Resultat vergleichbar mit einer Gradientenelution ist. Obwohl bereits viel zu den Monolithen im Allgemeinen [5-8] und zum Flussprogramm im Speziellen [4 und dort zitierte Referenzen] publiziert wurde, hat bisher niemand den Einfluss solch eines Flussprogramms auf die Reproduzierbarkeit der Analysenergebnisse untersucht. Diese Arbeit soll diese Frage beantworten und zeigen, dass ein Flussprogramm tatsächlich sehr gut geeignet ist die Analysenzeit zu verkürzen, ohne dabei die Nachteile einer Gradientenelution zu bieten.

Es fällt nicht schwer nachzuvollziehen, dass mit technisch immer mehr ausgefeilten Geräten auch die Anfälligkeit für Störungen und somit auch das Risiko für Fehlfunktionen steigt. Viele solcher Fehlfunktionen führen nicht sofort zu einem Totalausfall des Gerätes, sondern können vom Benutzer lange Zeit unbemerkt falsche Analysenergebnisse liefern. Dies ist besonders fatal, wenn von diesen Ergebnissen wichtige Aussagen zu beispielsweise pharmazeutischer Qualität abhängen.

Ein solches Risiko einzugehen wäre natürlich untragbar, weswegen es auch Maßnahmen gibt es zu minimieren. Die Grundlegendste davon ist die sogenannte Qualifizierung von analytischen Instrumenten (engl. Analytical Instrument Qualification – AIQ) [9]. Dies ist eine Reihe von Verfahren bei denen zu dokumentierende Prüfungen regelmäßig durchgeführt werden, um eine Aussage über die Funktionstüchtigkeit eines analytischen Gerätes zu treffen. Leider ist diese Vorgehensweise sehr zeit- und somit auch kostenintensiv. Häufig werden außerdem externe Firmen oder Consulting Unternehmen mit der Durchführung beauftragt, was die Kosten nochmals erhöht.

Bisher wurde von niemandem untersucht, ob diese Geräte relevanten Informationen auch aus Routinedaten, wie den alltäglichen Systemeignungstests (engl. System suitability test – SST) gewonnen werden könnten. In der Regel wird dies bezweifelt und meistens von vornherein ausgeschlossen [10, 11].

Ein Ziel dieser Arbeit ist es darum ein Konzept zur Zeit- und Kostenersparnis bei der Durchführung der AIQ zu präsentieren, ohne dabei auf Datensicherheit verzichten zu müssen. Dazu soll eine Liste von relevanten Parametern, die für eine umfassende Einschätzung der Systemleistung nötig sind, erstellt werden. Es soll mit wissenschaftlichen Methoden überprüft werden, ob diese Parameter mindestens gleichwertig aus täglichen SSTs ermittelt werden können. Über diese Arbeit hinaus müssen die Skeptiker überzeugt werden, dass dieses neue Konzept alltagstauglich ist und gegenüber dem klassischen Ansatz viele Vorteile besitzt [12].

Wie bereits erwähnt, bietet die HPLC dank einer stetig steigenden Zahl von stationären Phasen und immer leistungsfähigeren Geräten ein großes analytisches Potential. Leider gilt dies fast ausschließlich für niedermolekulare Verbindungen ($M_r < 800\text{Da}$). Problematisch hingegen, ist die Analytik von Makromolekülen ($M_r > 1000\text{Da} = 1\text{kDa}$) mittels klassischer HPLC, da die großen Moleküle teilweise sehr stark an der stationären Phase adsorbieren und die hohen Scherkräfte innerhalb der Säule einer sicheren Charakterisierung der Analyten im Wege stehen. Bisweilen werden vom Ph.Eur. spezielle, großporige stationären Phasen gefordert [13]. Bei der Analytik von Makromolekülen, sowohl synthetischen, als auch Biopolymeren, stand bislang die Bestimmung der Teilchengröße und der Größenverteilung im Vordergrund, da sie für

die besonderen Eigenschaften dieser Stoffe, auf denen zahlreiche Anwendungen basieren, verantwortlich sind [14, 15]. Für diese Aufgabe bietet unter anderem die Flüssigkeitschromatographie in Form der Größenausschlußchromatographie (engl. Size Exclusion Chromatography – SEC) eine Lösung [16].

Seitdem das Potential von proteinbasierten Pharmazeutika, der sogenannten Biologicals, bei der Behandlung von immunvermittelten und kanzerösen Erkrankungen erkannt wurde [17-19], ist die Anzahl der zugelassenen und der sich noch in der Pipeline befindlichen Biologicals drastisch angestiegen [20, 21]. Damit reicht die Teilchengrößenbestimmung alleine nicht mehr aus, um Biopolymere zu charakterisieren. Es besteht zunehmend Bedarf nach analytischen Methoden für eine sichere und zuverlässige Quantifizierung der Biologicals. Klassische Methoden zur Proteinquantifizierung, wie die Proteinbestimmung nach Lowry [22] oder der Bradford Test [23] bieten trotz ihrer Nachteile sogar akzeptable Bestimmungsgrenzen, jedoch keine Möglichkeit der Proteintrennung. Die Gelelektrophorese auf der anderen Seite trennt sogar komplexe Gemische von Proteinen. In jüngster Zeit sind große Erfolge bei der Verbesserung der Präzision erreicht wurden [24], was diese Technik zunehmend zu einer echten Alternative für die Quantifizierung im Sinne einer Qualitätskontrolle werden lässt. Neue massenspektrometrischen Methoden wie die iTRAQ-MALDI-TOF-MS (isobaric tags for relative and absolute quantification – matrix assisted laser desorption and ionization – time of flight – mass spectrometry) zeigen zwar gute Ergebnisse [25], sind auf der anderen Seite aber leider sehr teuer, aufwändig bei der Probenvorbereitung und Auswertung und bislang noch zu unpräzise für den Einsatz in der Routineanalytik. Bislang wurde kaum versucht die SEC für die Quantifizierung eines Proteingemisches einzusetzen, da hier aufgrund der Technik selbst nur eine geringe Peakkapazität und eine schlechte Auflösung zwischen Proteinen ähnlicher Größe erreicht werden kann.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist es daher zu zeigen, dass die kostengünstige SEC durchaus für quantitative Aufgaben im Bereich der Proteinanalytik eingesetzt werden kann. Dazu werden verschiedene Möglichkeiten zur Peakflächenbestimmung vorgestellt und es wird gezeigt, dass der Schlüssel einer korrekten Quantifizierung mittels SEC in der leistungsfähigen, sogenannten nicht-idealen SEC liegt.

Das abschließende Kapitel dieser Arbeit soll kurz auf einen wichtigen Teil der Pharmazeutischen Analytik eingehen, nämlich den Transfer von Analytischen Prozeduren (engl. Transfer of Analytical Procedures = TAP) oder kurz Methodentransfer. Neue analytische Methoden müssen üblicherweise von dem Ort wo sie entwickelt wurden (sendendes Labor) zu dem Ort bzw. den Orten wo sie routinemäßig eingesetzt werden sollen (empfangendes Labor) hin transferiert werden. Seit jeher wird mithilfe statistischer Tests überprüft, ob ein solcher Transfer erfolgreich war und die Methode im Routineeinsatz genauso richtige und präzise Daten liefert, wie es beabsichtigt war. Es hat sich schnell gezeigt, dass hier der Zweistichproben t-Test nur unbefriedigende Ergebnisse liefert und sich durch Pseudooptimierung der Daten manipulieren lässt [26, 27]. Daher sollten heute bei einem Methodentransfer die schon aus den Bioäquivalenzstudien von Westlake [28] bekannten Äquivalenztests benutzt werden [26].

Obwohl es keine speziellen Richtlinien für den Methodentransfer gibt, haben verschiedene Aufsichts- und Regulierungsbehörden (u.a. FDA, MCA, HPB und die AAPS) in Zusammenarbeit mit der *International Society of Pharmaceutical Engineering* (kurz: ISPE) ein Handbuch herausgegeben [29], mit dem eine solide, wissenschaftliche Grundlage für Transferaktivitäten geschaffen wurde. Das ISPE-Konzept empfiehlt ebenfalls den Einsatz von Äquivalenztests, schlägt Akzeptanzgrenzen vor und bietet zudem Versuchsdesigns sowie nützliche Checklisten und Vorlagen für Transferprotokolle. Es zeigt jedoch auch Schwächen. Vor allem wenn die Fehlerkomponente, die durch die Analytiker selbst eingebracht wird ansteigt, führt dies entweder zur Ablehnung eines gültigen Transfers oder zu einem immensen Arbeitsaufwand bei der Überarbeitung des Transferdesigns.

In dieser Arbeit soll deswegen ein erweitertes ISPE Konzept vorgestellt werden. Es wird demonstriert, dass ein neu eingeführter Skalierungsfaktor und ein bereits vorgestellter generalisierter Ansatz [26] zu einer erleichterten Auswahl des für die jeweilige Situation am besten geeigneten Transferdesigns und somit zu einer nennenswerten Arbeits- und Kostenersparnis sowie zu sicheren Transfers führen.

2. Theoretische Grundlagen

2.1. High Pressure oder High Performance?

HPLC stand in der Anfangszeit dieser Technik für High Pressure Liquid Chromatography, also Hochdruckflüssigchromatographie. Diese Bezeichnung ist durchaus passend, da bei dieser Technik eine leistungsfähige Pumpe die mobile Phase unter hohem Druck (bis zu 400 bar) durch eine mit der stationären Phase dichtgepackte Edelstahlsäule presst. Im Laufe der Zeit hat sich jedoch immer mehr die Bezeichnung „High Performance Liquid Chromatography“, also Hochleistungsflüssigchromatographie durchgesetzt, da durch die mit immer kleineren Partikeln, immer dichter gepackten Säulen sehr schnell Trennstufenzahlen von mehreren Tausend theoretischen Böden (N) erreicht wurden [30]. Es konnten somit bis dahin flüssigchromatographisch untrennbare Gemische analysiert werden, weswegen die Technik als besonders leistungsfähig gilt. Im Folgenden sollen die einzelnen Bausteine (Module) einer typischen HPLC Anlage [Abb. 2-1] beschrieben werden.

2.2. Aufbau einer HPLC Anlage

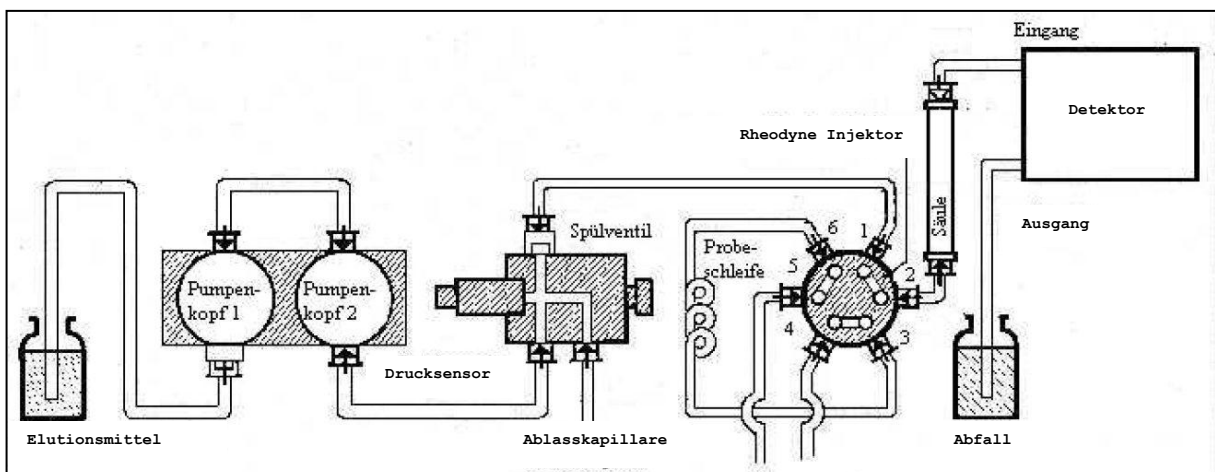


Abb. 2-1: schematischer Aufbau einer HPLC Anlage

2.2.1. Vorratsgefäß für das Elutionsmittel (= mobile Phase)

In diesen Gefäßen wird die mobile Phase (= Elutionsmittel oder Eluent) bereitgehalten. Sie bestehen aus Glas, da bei Plastikflaschen die Gefahr besteht, dass Weichmacher in die mobile Phase übertreten und zu Störungen am Detektor

führen könnten. Die Flaschen sollen nach Möglichkeit oben verschlossen sein, um ein Ausgasen möglicher flüchtiger Bestandteile zu verhindern. Der Eluent wird durch einen aus Teflon oder aus Edelstahl bestehenden [31] Schlauch aus dem Gefäß gesogen. Als mobile Phase werden Lösungsmittel von besonderer Qualität und Reinheit (HPLC-grade) verwendet, um so sicherzustellen, dass keine Verunreinigungen oder Kleinstpartikel die Analyse stören, oder sogar das Instrument beschädigen. Häufig wird zusätzlich eine Edelstahl- oder Keramikfritte am Ende des Ansaugschlauchs angebracht, um die mobile Phase zu filtern.

Die mobile Phase dient in der Chromatographie dazu die Analyten in gelöster Form an der stationären Phase vorbeizuführen, damit diese dort je nach eingesetzter Technik getrennt werden können (siehe Abschnitt 2.2.4.1-3).

2.2.2. Pumpe und Gradientenmischer

Die Pumpe saugt die mobile Phase an und pumpt sie über den Injektor durch die Trennsäule. Um reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen, muss die Pumpe kontinuierlich und vor allem pulsationsfrei arbeiten. Dies wird durch die sogenannten Kolbenpumpen realisiert, wobei die Kurzhubkolbenpumpe gegenüber der Langhubkolbenpumpe den Vorteil eines nicht begrenzten Lösemittelvorrats besitzt [30]. Die mit Partikeln der stationären Phase gepackten Trennsäulen stellen ein großes Hindernis für die mobile Phase dar. Deswegen muss die Pumpe enorme Drücke aufbauen, um die mobile Phase samt Analyten hindurchzupressen. Der anzulegende Druck ist direkt proportional zu der Säulenlänge und der Flußrate der mobilen Phase. Er ist umgekehrt proportional zu der Temperatur der Säule und zu dem Quadrat des Partikeldurchmessers der stationären Phase [4]. Das heißt: Halbiert man den Partikeldurchmesser, um eine höhere Trennleistung zu erreichen (s. Abschnitt 2.3.2.), so vervierfacht sich der Druck, den die Pumpe aufbauen muss. Im analytischen Routineeinsatz befinden sich heute gepackte Säulen mit Partikeln von 3 – 10µm Durchmesser [32]. Bei Säulendimensionen von 125 * 4,6mm, 5µm und einer linearen Fließgeschwindigkeit von 6 cm/min, muss die Pumpe einen Druck von etwa 100 – 150 bar aufbauen [4]. Bei etwa 400 bar liegt der maximal erreichbare Druck [33], allerdings sollte schon viel früher abgeschaltet werden, um Säule und Gerät zu schonen. Trotz der herrschenden hohen Drücke bergen die HPLC Pumpen jedoch keine Explosionsgefahr, da sich Flüssigkeiten, anders als Gase, praktisch nicht komprimieren lassen (nur etwa 1% auf 100 bar) [30]. Nichtsdestoweniger ist

eine Leckage im Hochdrucksystem gefährlich, da hier ein Flüssigkeitsstrahl hinausschießen kann.

Der Gradientenmischer ermöglicht das Mischen von zwei oder mehr verschiedenen Eluenten. Man unterscheidet einen *Niederdruckgradienten*, bei dem eine Pumpe alle Komponenten der mobilen Phase ansaugt und sie noch vor dem Pumpvorgang auf die Säule im entsprechenden Verhältnis mischt, von einem *Hochdruckgradienten*, bei dem jede Komponente von einer eigenen Pumpe gefördert wird und diese dann unter hohem Druck miteinander gemischt werden. Es müssen immer alle Komponenten miteinander mischbar sein. Hält der Gradientenmischer die Zusammensetzung der mobilen Phase über den gesamten Analysenverlauf konstant, handelt es sich um eine *isokratische* Elution. Wird die Zusammensetzung im Laufe der Analyse verändert, z.B. weil man die Elutionskraft (siehe Abschnitt 2.2.4.1-2.) steigern möchte, um spät oder gar nicht eluierende Substanzen zu beschleunigen, so handelt es sich um eine *Gradientenelution*. Die Veränderung der Zusammensetzung kann inkrementell oder linear erfolgen.

2.2.3. Injektor / Autosampler

Dieses Bauteil dient dazu die Probe in die mobile Phase einzubringen, bevor diese die Trennsäule erreicht. Als Probe können sowohl feste als auch flüssige Substanzen genommen werden, solange sie in der entsprechenden mobilen Phase auch löslich sind. In der Regel werden mit der HPLC nicht flüchtige oder thermolabile Substanzen analysiert, da diese nicht oder nur sehr eingeschränkt mit der verwandten Technik, der Gaschromatographie untersucht werden können. Ein *manueller Injektor* (z.B. der Rheodyne-Injektor) wird für einzelne Analysen verwendet. Mit einer Mikroliter Spritze wird die Dosierschleife eines definierten Volumens befüllt. Wird der Injektor aus der LOAD in die INJECT Stellung umgelegt, so wird die mobile Phase durch die Dosierschleife geleitet und nimmt das gesamte Injektionsvolumen auf.

Für lange Analysenserien, wie sie in der routinemäßigen Arzneimittelkontrolle üblich sind, ist ein manueller Injektor aufgrund des hohen personellen Aufwands nicht geeignet. In solchen Fällen bedient man sich eines *Autosamplers*. Hier können einige Hundert Probenfläschchen (engl. vials) in einem Probenblock (engl. samplerack) untergebracht und dann automatisiert nacheinander injiziert und untersucht werden. Auf diese Weise kann die HPLC Anlage über Nacht oder über das Wochenende laufen, ohne dass ein Techniker eingreifen muss. Dies spart hohe Personalkosten.

Es muss nur sichergestellt sein, dass genügend mobile Phase vorhanden ist und dass das Abfallgefäß nicht überläuft.

Die Richtigkeit und die Präzision sind bei beiden Injektionsarten praktisch gleich gut (siehe Abschnitt 4.4.2.1.).

2.2.4. Trennsäule

Die Trennsäule bildet das Herzstück der HPLC-Anlage. Obwohl alle Bauteile für eine erfolgreiche Analyse wichtig sind, findet in der Säule, und zwar an der im Inneren befindlichen stationären Phase, die eigentliche chromatographische Trennung statt. HPLC Säulen gibt es in verschiedensten Längen und Durchmessern [Abb. 2-2].



Abb. 2-2: Verschiedene HPLC-Säulen

In der Regel bestehen die HPLC-Säulen aus einem Edelstahlrohr, welches dicht mit Partikeln der stationären Phase gepackt ist (gepackte Säule). Soll die Trennung bei einer bestimmten Temperatur erfolgen, so kann ein *Säulenofen* eingesetzt werden. Da Edelstahl gut wärmeleitend ist, können die Säulen und mit ihnen der gesamte Trennvorgang gut temperiert werden. Problematischer ist der Einsatz monolithischer Säulen in so einem Ofen [4], da diese aus Polyetheretherketon (PEEK) bestehen und PEEK eine schlechte Wärmeleitfähigkeit von nur 0,25 W/(m·K) besitzt [34].

2.2.4.1. Normalphasenchromatographie

Als stationäre Phase werden stark polare Substanzen, wie Aluminiumoxid (AlO_2) oder Kieselgel (amorphes SiO_2) eingesetzt. Als mobile Phase werden unpolare bis mittelpolare Lösungsmittel verwendet. Diese sind in der sogenannten *eluotropen Reihe* nach ihrer Elutionskraft geordnet. Je polarer die Lösungsmittel sind, desto

größer ist ihre Elutionskraft und desto schneller können sie die Analyten von der Säule eluieren. Bei den Analyten handelt es sich hier um polare Substanzen, die unter anderem aufgrund von Van-der-Waals-Kräften mit der stationären Phase unterschiedlich stark wechselwirken (adsorbieren) und somit unterschiedlich lange zum Verlassen der Säule benötigen. Man spricht deshalb auch von Adsorptionschromatographie.

2.2.4.2. Umkehrphasenchromatographie (engl. Reversed Phase = RP)

RP-Phasen bestehen aus unpolar gemachtem Kieselgel. Dies geschieht durch Umsetzung mit Alkylsilylchloriden (=Alkylchlorosilanen) in einem Vorgang der als Silanisierung bezeichnet wird. Auf diese Weise werden die polaren Silanolgruppen des Kieselgels mit Alkylresten stark unpolar gemacht. Gängige Kettenlängen bestehen aus vier, acht oder achtzehn Kohlenstoffatomen, was sich auch in der

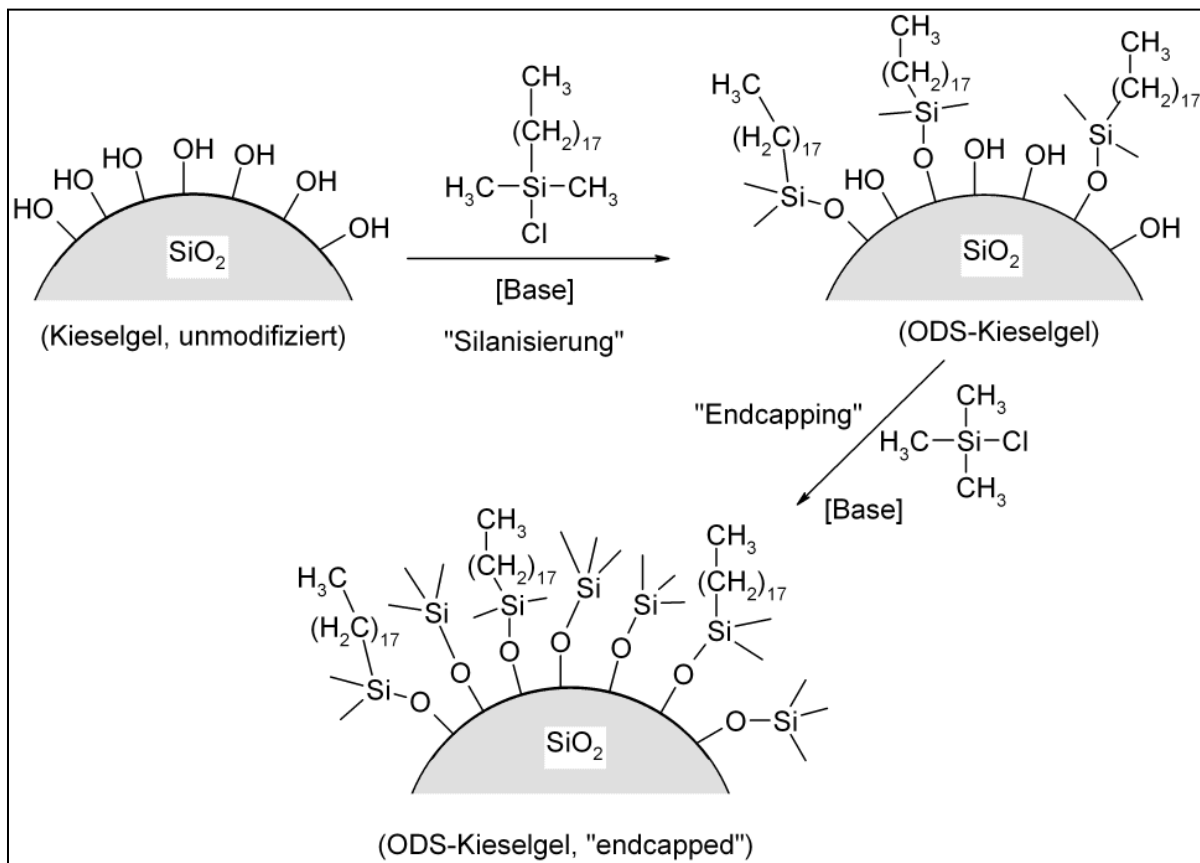


Abb. 2-3: Silanisierung mit Octadecyldimethylchlorosilan (ODS) und Endcapping mit Trimethylchlorosilan. (Aus Wikimedia Commons von User Dschanz freigegeben)

Bezeichnung der Phase widerspiegelt (RP-4, RP-8, RP-18) [ph.Eur. 4.1.1.]. Nach der Silanisierung mit langkettigen Chlorosilanen werden übriggebliebene, sterisch gut abgeschirmte Silanolgruppen mit Trimethylsilylchlorid unpolar gemacht [Abb. 2-3]. Dies nennt man Endcapping [35].

Die eluotrope Reihe ist auf einer Umkehrphase ebenfalls umgekehrt. Mit steigender Polarität der Lösungsmittel, sinkt die Elutionskraft.

Obwohl die unpolaren Ketten fest an den Silanolgruppen gebunden sind, ähneln sie einem Flüssigkeitsfilm. In diesen können Analyten aus der mobilen Phase übergehen und sich in ihm verteilen. Man spricht deswegen auch von Verteilungschromatographie. Die RP-HPLC macht heutzutage den überwiegenden Teil der HPLC-Methoden aus, da sie zum einen universeller als die NP-HPLC einsetzbar ist, weil sowohl polare als auch unpolare Substanzen getrennt werden können und zum anderen weil die als mobile Phase verwendeten Lösungsmittel günstiger und weniger umweltbelastend sind [30].

2.2.4.3. Größenausschlußchromatographie

Diese Art der Chromatographie unterscheidet sich prinzipiell von den bereits erwähnten Methoden. Hier findet die Trennung nur aufgrund unterschiedlicher Molekülgrößen, ohne weitere Interaktion mit der stationären Phase, statt. Mehr dazu in Kapitel 5.

2.2.5. Detektor

Der Detektor soll die physikochemischen Eigenschaften der Analyten in elektrische Signale umwandeln. Diese Signale werden dann an einen Rechner übermittelt, welcher sie gegen die Zeit aufträgt und anschließend in Form eines äußeren Chromatogramms ausgibt. Ein Detektor ist nur dann für eine Quantifizierung geeignet, wenn die Stärke des erzeugten Signals abhängig von der Konzentration des Analyten ist. Sinnvollerweise sollte diese Abhängigkeit über einen möglichst großen Konzentrationsbereich linear sein, um eine Kalibriergerade für eine einfache Quantifizierung des Analyten erstellen zu können.

2.2.5.1. UV/VIS und DA-Detektor

Im Prinzip handelt es sich hierbei um ein UV-Spektrometer, welches anstelle einer Küvette eine Durchflussszelle, durch die permanent monochromatisches Licht einer bestimmten Wellenlänge durchgestrahlt wird, besitzt. Bewegen sich UV-aktive Analyten durch den Strahlengang, so registriert der Detektor eine Absorption und der Rechner erzeugt einen Peak im Chromatogramm. Da die meisten organischen Substanzen über mehr oder weniger stark ausgeprägte Chromophore verfügen und somit UV aktiv sind und weil außerdem die Absorption über einen großen

Konzentrationsbereich dem Lambert-Beer-Gesetz (Gl. 1) folgt, ist der UV/VIS-Detektor der am häufigsten eingesetzte Detektor in der HPLC [3, 32].

$$\lg \frac{I_0}{I} = A = \varepsilon \cdot c \cdot b = A_{1cm}^{1\%} \cdot \beta \cdot b \quad (\text{Gl. 1})$$

Dabei gilt:

$$A_{1cm}^{1\%} = \frac{10 \cdot \varepsilon}{M_r} \quad (\text{Gl. 2})$$

I_0 = Intensität der eintretenden, monochromatischen Strahlung

I = Intensität der austretenden, monochromatischen Strahlung

A = Absorption (früher auch Extinktion genannt)

ε = molarer Absorptionskoeffizient

c = Konzentration in mol/L

$A_{1cm}^{1\%}$ = spezifische Absorption

β = Massenkonzentration in g/100mL

b = Schichtdicke in cm

M_r = relative Molmasse

Der DA Detektor (engl. Diode Array Detector = DAD) ist eine Weiterentwicklung des bewährten UV/VIS-Detektors. Anstatt einer Wellenlänge werden hier alle Wellenlängen eines definierten UV Bereichs durchgestrahlt. Erst nach Interaktion mit dem Analyten wird das Licht in einzelne Wellenlängen zerlegt, welche dann durch Photodioden registriert werden. Zu jeder Substanz wird somit ein komplettes UV-Spektrum aufgenommen. Auf diese Weise können auch im Nachhinein einzelne Wellenlängen angewählt und einzelnen Peaks im Chromatogramm die Besten zugeordnet werden. Zudem können, bei Vorhandensein einer Spektrendatenbank, Reinheit und Identität des Analyten bestimmt werden.

2.2.5.2. Andere Detektoren

Es soll an dieser Stelle nur erwähnt werden, dass eine Vielzahl von Detektoren für die HPLC zur Verfügung stehen. Neben Detektoren, die die Leitfähigkeit, den Drehwinkel oder den Brechungswinkel messen, stehen auch Verdampfungs-Lichtstreu- und Fluoreszenzdetektoren zur Verfügung. Einen tieferen Einblick in diese Detektionsarten bieten folgende Literaturquellen [3, 36]. Eine zunehmend wichtige Rolle spielt die Kopplung der HPLC mit der Massenspektrometrie (LC-MS) [37]. Eine detaillierte Beschreibung einer verwandten Kombination, der Verbindung von

Kapillarelektrophorese mit der MS (CE-MS) bietet die Dissertationsschrift von Jens Ohnesorge [38].

2.2.5.3. Rauschen

Als Rauschen (engl. Noise) bezeichnet man in der Physik messbare unregelmäßige Stromschwankungen [39]. Dafür verantwortlich ist der sogenannte Dunkelstrom, also die spontane Bildung von freien Ladungsträgern durch Wärme in einem lichtempfindlichen Halbleiter. Man bemerkt das Rauschen, wenn man einen Ausschnitt einer gerade erscheinenden Basislinie nur stark genug vergrößert. Dieses Phänomen lässt sich nicht komplett beseitigen, jedoch sehr wohl durch gute Erdung des Detektors und die Abschirmung von anderen elektronischen Bauteilen stark minimieren. Vor allem aber tragen Verunreinigungen und eine nicht vollständig entgaste mobile Phase zum Rauschen bei. Deswegen müssen zwingend Chemikalien von HPLC-Qualität benutzt werden.

2.2.5.4. Drift

Nach Einschalten der HPLC-Anlage lässt sich ein Abwandern der Basislinie feststellen bis die Bauteile und allen voran der Detektor ihre Betriebstemperatur erreichen. Basisliniendriffs im laufenden Betrieb können bei einem ansonsten einwandfrei funktionierenden Detektor vor allem bei einer Gradientenelution auftreten, wenn sich der Brechungsindex der mobilen Phase ändert, was von einem UV-Detektor erfasst werden kann.

2.2.6. Auswertesystem

Ursprünglich bestand das Auswertesystem aus einem Integrator und einem Plotter für die Chromatogramme. Heutzutage werden Computer mit spezieller Auswertesoftware verwendet. Diese Software bietet dem Chromatographiker eine Vielzahl von Möglichkeiten, um selbst nicht ideale Trennungen auswerten zu können und bequem alle anfallenden Daten abzuspeichern.

2.3. Chromatographische Parameter

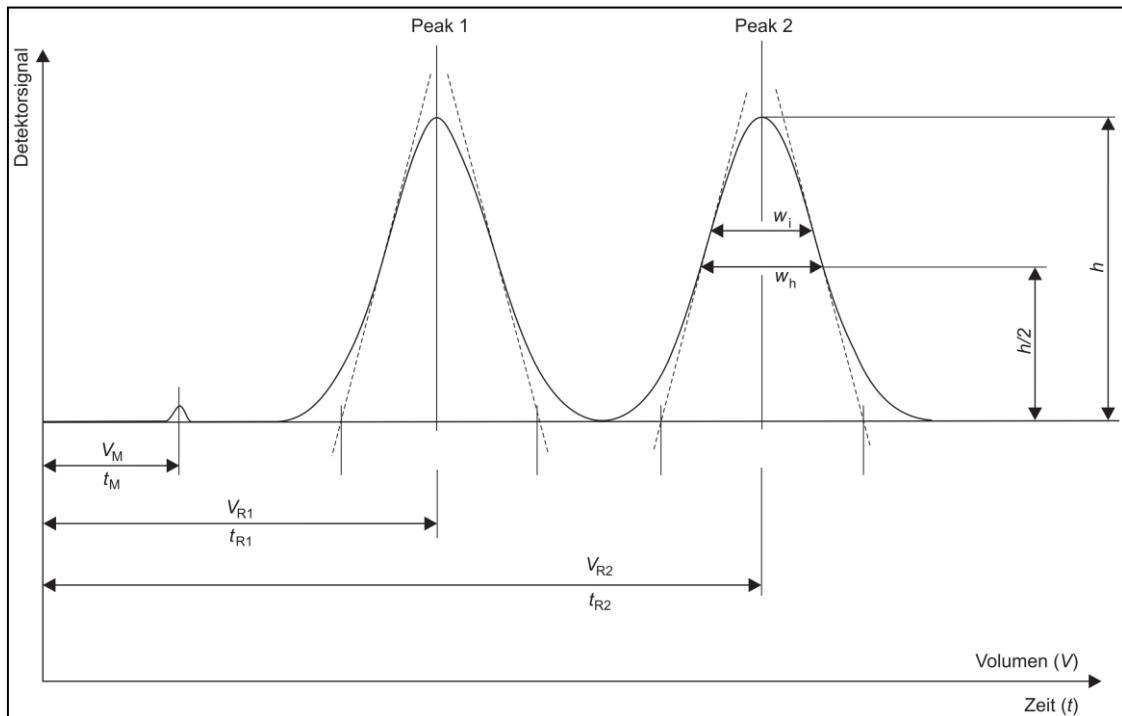


Abb. 2-4: Repräsentatives Chromatogramm welches die Berechnung der Peakparameter erläutert. (Aus Ph.Eur 6.4, Kapitel 2.2.46)

Die meisten chromatographischen Parameter lassen sich direkt aus den Kennzahlen eines Chromatogramms [Abb. 2-4] errechnen.

t_M = Totzeit: Die Zeit, welche die mobile Phase, oder ein nicht mit der stationären Phase interagierender Analyt vom Einspritzen bis zum Detektor benötigt.

t_R = Retentionszeit: Die Zeit, welche ein Analyt vom Einspritzen bis zum Detektor benötigt.

h = Höhe eines Peaks, gemessen von der Basis bis zum Scheitelpunkt.

$h/2$ = halbe Höhe eines Peaks

w_i = Peakbreite in der Höhe der Wendepunkte.

w_h = Peakbreite in halber Peakhöhe. (Bei einem Gauß-Peak gilt: $w_h = 1,18 \cdot w_i$)

$V_{M/R}$ = Tot- bzw. Elutionsvolumen. (Diese Angaben sind bei der SEC gebräuchlich (siehe Kapitel 5))

2.3.1. Kapazitäts- und Selektivitätsfaktor

Der Kapazitätsfaktor k' (Gl. 3) gibt an, wie gut eine Substanz von der stationären Phase zurückgehalten wird. Möglich sind Werte zwischen 0 (keine Retention - Substanz eluiert mit dem Totvolumen) und ∞ (vollkommene Retention - Substanz wird gar nicht eluiert). In der Praxis werden k' -Werte zwischen 2 und 5 angestrebt,

um sowohl eine angemessene Retention, als auch eine vernünftige Analysendauer zu erreichen.

$$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{t_R}{t_M} - 1 \quad (\text{Gl. 3})$$

Der Selektivitätsfaktor α (Gl. 4), häufig auch als *relative Retention* bezeichnet, gibt das Verhältnis zweier Kapazitätsfaktoren, und somit die Lage zweier Peaks relativ zueinander an. Anhand dieses Faktors lässt sich also eine Aussage über die Fähigkeit eines chromatographischen Systems zur Trennung von zwei verschiedenen Substanzen treffen. Ist $\alpha = 1$, so bedeutet dies, dass unter den gegebenen Bedingungen die beiden betrachteten Substanzen nicht getrennt werden können.

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} \text{ wenn gilt: } k'_2 \geq k'_1 \quad (\text{Gl. 4})$$

2.3.2. Trennleistung

Die Trennleistung oder auch Effizienz der Säule ist ein Maß für die Güte einer chromatographischen Trennung. Im Chromatogramm wird sie anhand der Breite der Peaks festgemacht. Je schmaler ein Peak, desto höher die Peakkapazität n (Gl. 7), d.h. desto mehr Peaks können innerhalb einer bestimmten Zeit vollständig aufgelöst eluieren [40]. Die Trennleistung wird als Zahlenwert in Form der *Trennstufenzahl* oder auch *Zahl der theoretischen Böden* N (engl. plate number) angegeben (Gl. 8). Häufig findet man auch die Angabe bezogen auf die Säulenlänge L , die sogenannte *theoretische Trennstufenhöhe* (engl. Height Equivalent to a Theoretical Plate = HETP) (Gl. 9)

$$n = 1 + \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \ln(1 + k'_{\max}) \quad (\text{Gl. 7})$$

$$N = 5,54 \cdot \left(\frac{t_R}{w_h} \right)^2 \quad (\text{Gl. 8})$$

$$HETP = \frac{L}{N} \quad (\text{Gl. 9})$$

L = Länge der Säule in cm

k'_{\max} = Kapazitätsfaktor bis zu dem die Anzahl der Peaks gezählt wird

Die Trennleistung eines Systems kann also erhöht werden, indem man die Anzahl der Trennstufen erhöht. Tabelle 2-1 [4] veranschaulicht, dass die Trennleistung proportional zur Säulenlänge und Temperatur steigt. Es wird auch deutlich, dass die Trennleistung auch mit kleiner werdenden Partikeln der stationären Phase steigt. Leider steigt auch der Druck proportional zur Säulenlänge und umgekehrt proportional zum Quadrat des Partikeldurchmessers. Mit Variation der Temperatur lassen sich zwar häufig bessere Trennergebnisse erreichen [41], es sollte jedoch bedacht werden, dass oft thermolabile Substanzen analysiert werden sollen. Trennleistung kann also nicht ohne weiteres erhöht werden, weswegen bereits seit einiger Zeit an neuen Möglichkeiten zu einer schnelleren und effizienteren HPLC geforscht wird (siehe Abschnitt 3.).

Tab. 2-1: Einfluss von Säulenlänge, Flussrate, Partikeldurchmesser und Säulentemperatur auf die Analysenzeit, den Druck und die Trennleistung

	Säulenlänge (L)	Flussrate (F)	Partikeldurch- messer (d_p)	Säulen- temperatur (T)
Analysenzeit	$\sim L$	$\sim 1/F$	indirekt beeinflusst	$\sim 1/T$
Druck	$\sim L$	$\sim F$	$\sim 1/(d_p)^2$	$\sim 1/T$
Trennleistung	$\sim L$	s. v-D-Plot	$\sim 1/d_p$	$\sim T$

Aus Tabelle 2-1. wird ebenfalls ersichtlich, dass die Trennleistung auch von der Fließgeschwindigkeit u abhängt. Der Zusammenhang zwischen der Trennstufenhöhe und der Fließgeschwindigkeit ist in der van-Deemter (Gl. 10) zusammengefasst.

$$HETP = A + \frac{B}{u} + C \cdot u \quad (\text{Gl. 10})$$

A = Eddy-Diffusion (Mehrwegseffekt)

B/u = Longitudinal Diffusion (Längsdiffusion)

$C \cdot u$ = Massentransfer

Der van-Deemter Plot [Abb. 2-5.] verdeutlicht, dass es nur einen sehr begrenzten Bereich gibt, in dem die optimale Fließgeschwindigkeit u_o liegt.

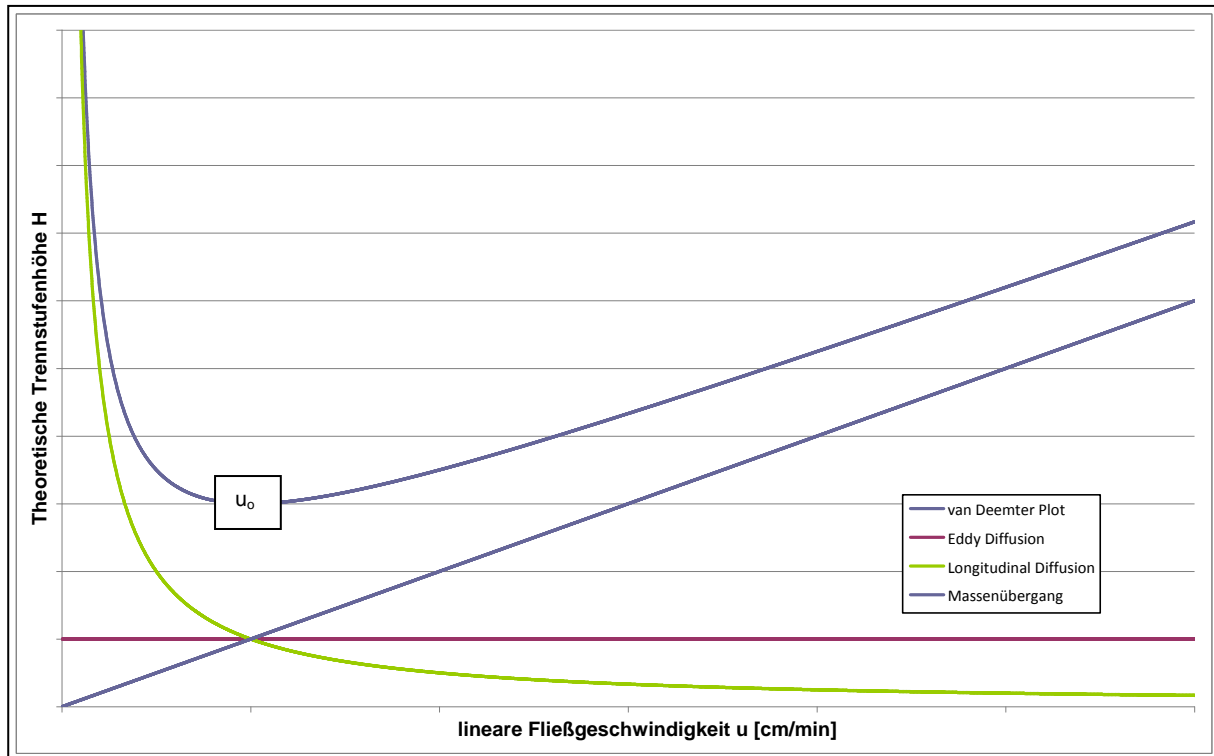


Abb. 2-5: ein repräsentativer van-Deemter-Plot. Man kann direkt die optimale Fließgeschwindigkeit u_o ablesen.

2.3.3. Auflösung

Die Auflösung R_S ist ein Maß dafür, inwieweit zwei getrennte Substanzen im Chromatogramm auch tatsächlich als zwei separate Peaks erkannt werden können. Sie ist von der relativen Retention α der Substanzen, als auch von der Trennstufenhöhe N der Säule abhängig. Bei sinkendem α müssen die Peaks schmaler werden ($N \uparrow$), wenn sie nicht ineinander laufen sollen. Dieser Zusammenhang wird zur Berechnung der Auflösung (Gl. 11) genutzt. Ohne Kenntnis aller chromatographischen Parameter, kann alternativ die Auflösung direkt aus einem Chromatogramm bestimmt werden (Gl. 12).

$$R_S = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \left[\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right] \cdot \left[\frac{k'_2}{k'_2 + 1} \right] \quad (\text{Gl. 11})$$

$$R_S = 1,18 \cdot \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_{h2} + w_{h1}} \quad (\text{Gl. 12})$$

Erreicht die Auflösung einen Wert von 1,5 oder darüber [Abb. 2-4.], spricht das Europäische Arzneibuch von Basislinientrennung [42].

2.3.4. Signal zu Rausch – Verhältnis

Verringert man die Konzentration eines Analyten, so nimmt die dazugehörige Peakfläche und Peakhöhe ab. Reduziert man die Konzentration nur weit genug, geht der Peak langsam im Rauschen des Detektors unter [Abb. 2-6.], bis er schließlich nicht mehr vom Rauschen zu unterscheiden ist. Um entscheiden zu können, ob es sich noch um einen Substanzpeak oder nur um Rauschen handelt, wurde das Signal zu Rausch-Verhältnis (engl. Signal to Noise ratio = S/N) eingeführt (Gl. 12).

$$\frac{S}{N} = \frac{2 \cdot H}{h} \quad (\text{Gl. 12})$$

H = Höhe des untersuchten Signals

h = maximale Amplitude des Rauschens, gemessen auf einem Abschnitt der Basislinie der mindestens dem fünffachen der Peakhalbwertsbreite entspricht [42].

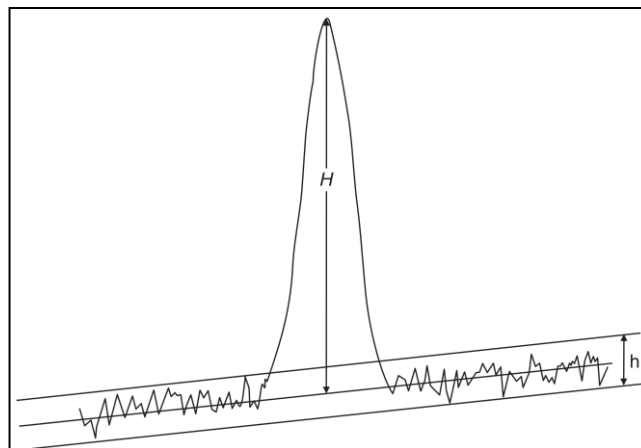


Abb. 2-6: zeigt wie das Signal zu Rausch-Verhältnis ermittelt wird (aus Ph.Eur. 6.4).

Das Signal zu Rausch-Verhältnis kann verbessert werden, indem entweder das Signal vergrößert wird, oder das Rauschen minimiert wird (siehe Abschnitt 2.2.5.3.). Eine Zusammenstellung der Möglichkeiten bietet Tabelle 2-2.

Tab. 2-2.: Möglichkeiten das Signal zu Rausch-Verhältnis zu verbessern [43]. Mit * markierte Maßnahmen werden von der Auswertesoftware durchgeführt.

Verbesserung von S/N	
Signal vergrößern	Rauschen verringern
- geeignetere Wellenlänge wählen	- Detektor Zeitkonstante erhöhen*
- besseren Detektor verwenden	- Signal Bündelung erhöhen*
- Analyten derivatisieren	- Bessere Temperaturkontrolle
- mehr Probe injizieren	- Verwendung von reinen Lösemitteln
- Peakbreite verringern - kleineren k'-Wert - kleineren Säulendurchmesser - N vergrößern	- mobile Phase besser mischen
	- Pulsation der Pumpe verringern

2.4. Validierungsparameter nach ICH Q2

Die International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) wurde 1990 von den Aufsichtsbehörden der USA, Europas und Japans sowie von Arzneimittel-Herstellerverbänden dieser Länder ins Leben gerufen. Ihr Ziel ist es die Beurteilungskriterien von Human-Arzneimitteln, welche als Basis der Arzneimittelzulassung gelten, zu harmonisieren. Dazu hat die ICH eine Reihe von verbindlichen Richtlinien (engl. guideline) herausgebracht. Die Q guidelines beschäftigen sich mit Qualitätsaspekten von Ausgangsstoffen und fertigen Arzneimitteln. In ihrer Qualitätsrichtlinie Q2 (R1) beschreibt die ICH einzelne Parameter, die für eine Methodenvvalidierung unerlässlich sind. Die Methodenvvalidierung ist der dokumentierte Nachweis, dass eine neu entwickelte Methode im Routineeinsatz auch tatsächlich zu den erwarteten Ergebnissen führt. Einige der nachfolgend aufgeführten Parameter werden auch im Bereich der Gerätequalifizierung zur Beurteilung der Systemleistung herangezogen (vgl. Kapitel 4.).

2.4.1. Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die Nachweisgrenze (engl. Limit of Detection = LOD) gibt diejenige Substanzkonzentration an, welche mit der vorgegebenen Methode mit einer ausreichend hohen Präzision noch detektiert werden kann. Zudem muss sichergestellt sein, dass das bei einer unbekannten Probe detektierte Signal

eindeutig der gesuchten Substanz zugeordnet werden kann. Eine Quantifizierung mit vorgegebener Präzision ist erst ab der Bestimmungsgrenze (engl. Limit of Quantitation = LOQ) durchführbar. Diese vorgegebene Präzision wird als maximale relative Standardabweichung $RSD\%_{max}$ von der ICH für die LOD mit 30,3% und für die LOQ mit 10% angegeben. Setzt man diese Werte in Gleichung 13 [44] ein, so kommt man zu den von der ICH geforderten Grenzen (Gl. 14-15) [45].

$$LOD \text{ bzw. } LOQ = \frac{\hat{\sigma}(c)}{RSD\%_{max}} \cdot 100\% \quad \text{wenn gilt:} \quad \hat{\sigma}(c) = \frac{\hat{\sigma}(y)}{a_1} \quad (\text{Gl. 13})$$

$$LOD = \frac{3,3 \cdot \hat{\sigma}(y)}{a_1} = 3,3 \cdot \hat{\sigma}(c) \quad (\text{Gl. 14})$$

$$LOQ = \frac{10 \cdot \hat{\sigma}(y)}{a_1} = 10 \cdot \hat{\sigma}(c) \quad (\text{Gl. 15})$$

$\hat{\sigma}(c)$ = Verfahrensstandardabweichung

$\hat{\sigma}(y)$ = Signal-Standardabweichung

a_1 = Steigung der Kalibrierfunktion

Die ICH bietet auch einen etwas starreren Ansatz, basierend auf dem S/N-Verhältnis, zur Bestimmung der LOD und der LOQ an. Ist S/N = 3 so gilt die LOD als erreicht. Ab einem S/N-Wert von 10 kann quantifiziert werden. Die großen Arzneibücher [46, 47] benutzen ausschließlich dieses Konzept. Für die Quantifizierung von Verunreinigungen oder in der Bioanalytik reicht dieses zumeist auch völlig aus. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit ist mit LOQ immer ein S/N-Verhältnis von mindestens 10 gemeint.

2.4.2. Richtigkeit

Ein Messwert oder Analysenergebnis wird als richtig bezeichnet, wenn eine Übereinstimmung mit dem wahren Wert vorliegt. Da dieser „wahre Wert“ häufig selbst unbekannt ist und erst durch Vermessung von Referenzsubstanzen erhalten wird, sollte an dieser Stelle besser von der Übereinstimmung mit einem allgemein akzeptierten Referenzwert ausgegangen werden. Im Englischen wird der Begriff *Accuracy* verwendet, wenn eine qualitative Aussage (richtig, oder nicht) getroffen wird. Im Unterschied dazu steht der Begriff *Bias* für eine konkrete, quantitative Angabe (wie weit weicht der Wert ab) der Richtigkeit [48]. Zur Ermittlung der

Richtigkeit werden die erhaltenen Ist- gegen die Soll-Werte aufgetragen. Bei richtigen Ergebnissen entsteht eine Ursprungsgerade mit der Steigung 1. Unterscheidet sich entweder die Steigung oder der y-Achsenabschnitt signifikant, d.h. die Abweichung ist nicht allein aufgrund zufälliger Streuung aufgetreten, von den Vorgaben, so liegt wahrscheinlich ein systematischer Fehler vor.

2.4.3. Präzision

Die Präzision einer Analysenmethode steht für die Übereinstimmung von Messwerten innerhalb einer Messreihe. Als Streuparameter gibt sie die zufällige Streuung der Messwerte um einen festen Wert, den sogenannten Lageparameter an. Gemessen wird die Präzision in Form der Varianz $\hat{\sigma}^2$ (Gl. 17) oder der Standardabweichung $\hat{\sigma}$ (Gl. 18). Die Messung der Präzision bezieht sich in der Regel auf eine Stichprobe der Größe n , und stellt somit nur einen Schätzwert (wird durch das „Dach“ über dem σ gekennzeichnet) der wahren Standardabweichung dar, für deren Ermittlung theoretisch unendlich viele Proben untersucht werden müssten. Als Lageparameter wird häufig der arithmetische Mittelwert \bar{x} (Gl. 16), also der Quotient aus der Summe aller Einzelmesswerte x_i und dem Stichprobenumfang n benutzt.

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad (\text{Gl. 16})$$

$$\hat{\sigma}^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1} \quad (\text{Gl. 17})$$

$$\hat{\sigma} = \sqrt{\hat{\sigma}^2} \quad (\text{Gl. 18})$$

Die Standardabweichungen bzw. die Varianzen verschiedener Verfahren oder Messungen können nicht direkt miteinander verglichen werden, da sie sich als Absolutwerte auf jeweils andere Lageparameter beziehen. Deswegen müssen sie erst normalisiert und in Form der relativen Standardabweichung (engl. Relative Standard Deviation = RSD% oder auch Coefficient of Variation = CV) (Gl. 19) ausgegeben werden. Diese prozentualen Angaben können dann direkt oder in statistischen Tests miteinander verglichen werden.

$$RSD\% = \frac{\hat{\sigma} \cdot 100\%}{\bar{x}} \quad (\text{Gl. 19})$$

Zur Gesamtpräzision tragen verschiedene Faktoren bei. Deswegen ist es bei Angabe von $\hat{\sigma}$ oder $RSD\%$ wichtig zu wissen, welche dieser Faktoren eine Rolle gespielt haben. Die ICH hat in der Richtlinie Q2 (R1) vier Präzisionsebenen [Abb. 2-7.] definiert, um die Angaben weltweit zu vereinheitlichen. Die Grundlegendste ist die *system precision* (Systempräzision, injection repeatability). Sie wird durch eine Mehrfachinjektion einer Probe direkt hintereinander ermittelt und bildet die Präzision des gesamten Messinstruments ab.

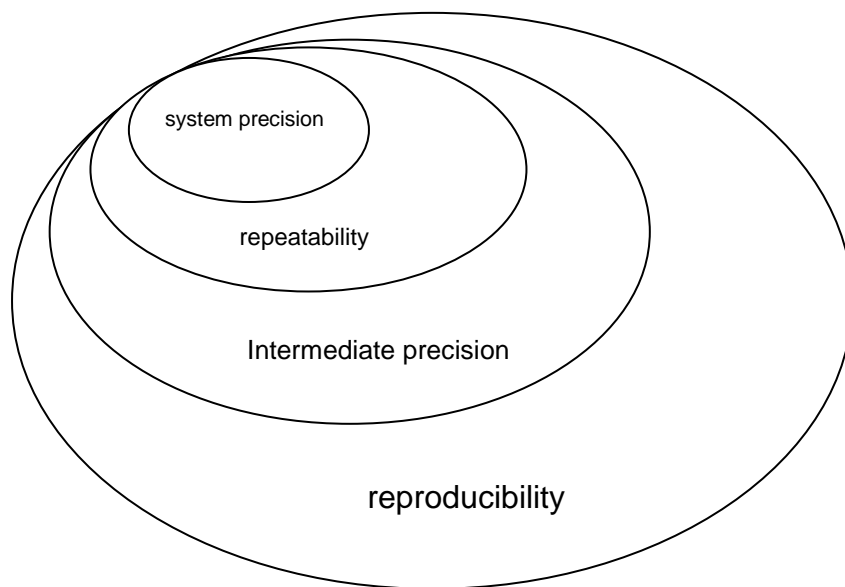


Abb. 2-7.: Die vier Ebenen der Präzision nach ICH Q2 (R1)

Die nächsthöhere Ebene ist die *repeatability* (Wiederholpräzision, Wiederhol-Standardabweichung). Zusätzlich zur Systempräzision wird hier durch mehrfache Anwendung des gesamten Analysenverfahrens samt Probenvorbereitung die Fehlerkomponente bestimmt, die bei gleichem Operator, gleichem Messinstrument und Testmaterial innerhalb einer Serie entsteht.

Wird die Wiederholpräzision in einem Labor an mehreren Tagen, durch unterschiedliche Analytiker mit unterschiedlichen Instrumenten und Standards

ermittelt, so spricht die ICH von der *intermediate precision* (Mehrtages-Standardabweichung, Intralabor-Standardabweichung, day-to-day precision).

Unter dem Begriff *reproducibility* (Ringversuchs-Standardabweichung, Interlabor-Standardabweichung) wird die Präzision verstanden, die unter gleichen Bedingungen in unterschiedlichen Laboratorien ermittelt wird. Hier werden insbesondere systematische Veränderungen durch äußere Einflüsse wie Kenntnisstand des Laborpersonals, Luftfeuchtigkeit, Reagenzienqualität, Temperatur und weitere Faktoren berücksichtigt.

Mit jeder Präzisionsebene nimmt die Streuung immer zu, also die Präzision ab. Die Ringversuchs-Standardabweichung kann niemals kleiner sein als die Mehrtages-Standardabweichung. Diese wiederum ist nie kleiner als die Wiederholpräzision. Die Systempräzision liefert immer das beste Ergebnis. Wie stark sich die einzelnen Präzisionsebenen unterscheiden, hängt von der *Robustheit* der Methode ab.

2.4.4. Robustheit

Eine Methode, die wenig empfindlich gegen die beschriebenen äußeren Einflüsse und kleine Veränderungen im Meßsystem reagiert, wird als robust bezeichnet. Bei robusten Methoden liegen die Werte der Ringversuchs-Standardabweichung und der Mehrtages-Standardabweichung nur ein wenig höher, als die der Wiederholpräzision.

3. Die schnelle HPLC

Es ist nicht eindeutig definiert, was unter dem Begriff „schnelle HPLC“ (engl. Fast-HPLC) zu verstehen ist. Natürlich soll die Verkürzung der Analysenzeit im Vordergrund stehen, jedoch soll und darf sie nicht übermäßig die Effizienz beeinflussen. Halbiert man die Säulenlänge, so verkürzt sich zwar die Analysenzeit auf die Hälfte aber es halbiert sich auch die Trennstufenzahl und die Effizienz sinkt. Bei Verdopplung der Fließgeschwindigkeit, sinkt die Effizienz ebenfalls [Abb. 2-5.]. Diese Problematik ist schon seit geraumer Zeit bekannt. Bereits in den 1970er Jahren postulierte der Chromatographiker Istvan Halász die „Ultimate limits in High Performance Liquid Chromatography“ [49]. In seiner Arbeit konzentrierte er sich auf die Teilchengröße als Parameter zur Effizienzsteigerung und Analysenzeitverkürzung. Er wandelte die van-Deemter Gleichung (Gl. 10) so ab (Gl. 20), dass er die Kurvenverläufe für verschiedene Partikelgrößen simulieren konnte [Abb. 3-1.].

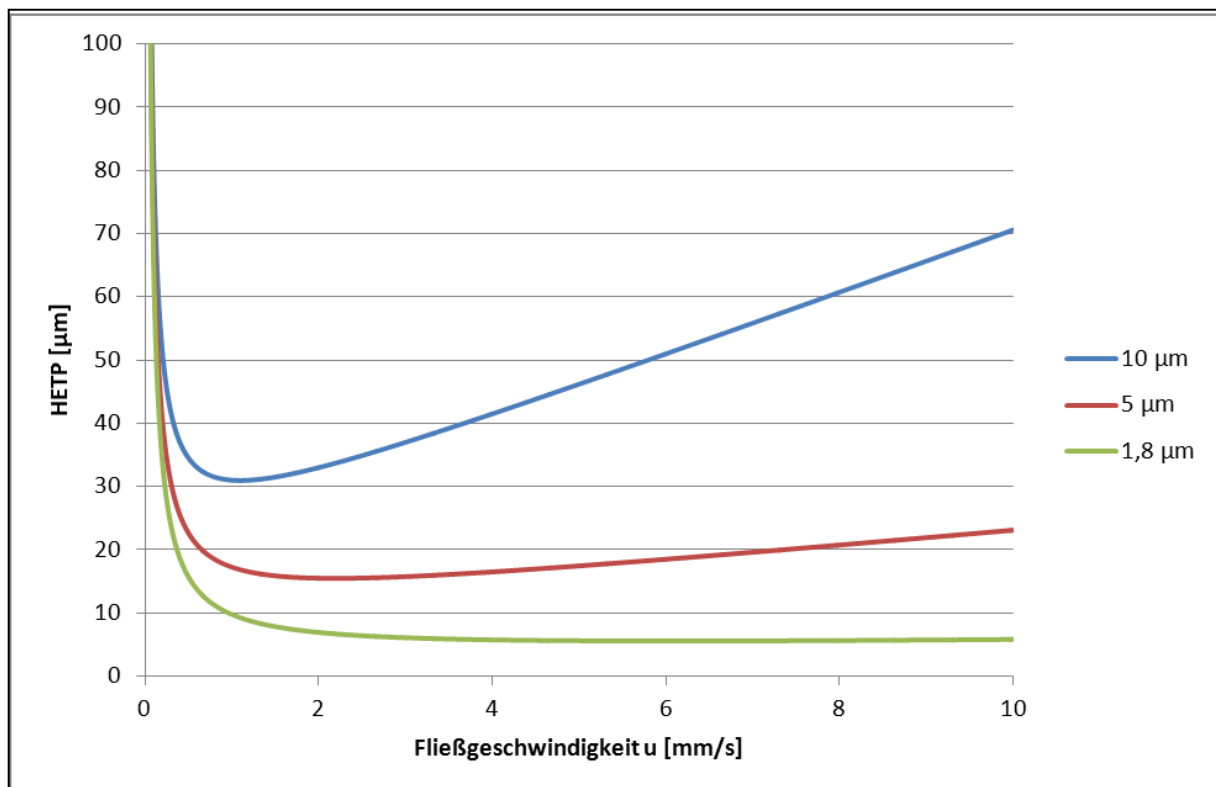


Abb. 3-1.: Simulierte van-Deemter Kurven für verschiedene Partikelgrößen in μm nach Halász.

$$HETP = 2d_p + \frac{6}{u} + \frac{d_p^2 u}{20} \quad (\text{Gl. 20})$$

d_p = Partikeldurchmesser in μm

In den 1970er Jahren war es jedoch technisch nicht möglich, so kleine Partikel mit einer gleichmäßigen Korngrößenverteilung herzustellen.

Heutzutage ist die Fertigungstechnik in der Lage Partikel mit einem Durchmesser von unter 2 μm herzustellen, sodass Halász Vorhersagen bestätigt werden konnten [50]. Der Einsatz dieser sogenannten sub-2- μm (<2 μm sprich: sub-two-micron) Partikel wird in der Ultra-High Performance LC (UHPLC) realisiert. Mit dieser Technik konkurrieren noch zwei weitere auf dem Feld der schnellen HPLC, nämlich die fused-core Partikel und die partikkelosen Monolithen.

3.1. UHPLC

Diese Technik basiert, wie schon erwähnt, auf Säulen, die mit porösen Partikeln <2 μm (1,8 μm) gepackt sind. Dadurch steigt die Trennleistung erheblich und es können kürzere Säulen verwendet werden. Wie aus Abbildung 2-7. deutlich wird, können auch bedeutend höhere Fließgeschwindigkeiten ohne Effizienzeinbußen genutzt werden, was die totale Analysendauer stark verkürzt. Dies und die Tatsache, dass bereits viele stationäre Phasen im sub-2 μm Maßstab existieren, haben zur Popularitätssteigerung der UHPLC in den letzten Jahren beigetragen [4]. Dennoch gibt es einen großen Nachteil dieser Technik. Trotz der verkürzten Säulen erzeugen die kleinen Partikel einen enormen Rückdruck, der weit über die üblichen 400 bar hinausgeht [50, 51]. Dies übersteigt die Leistungsfähigkeit herkömmlicher HPLC-Instrumente, sodass eine neue Generation von Geräten eingeführt werden musste. Im Wesentlichen unterscheiden sich diese neuen Geräte von den klassischen in drei Punkten. Es müssen spezielle Hochdruckpumpen verbaut werden, die Drücke bis zu 1400 bar (20000 psi) erzeugen und halten können. Dementsprechend müssen auch alle Zuleitungen diesen Druck aushalten können. Da die UHPLC Säulen üblicherweise ein kleineres Volumen als klassische Trennsäulen besitzen, muss das Totvolumen der Anlage verkleinert werden. Als Faustregel gilt, dass das Volumen zwischen Injektor und Detektor, welches nicht zur chromatographischen Trennung beiträgt, 10% des Säulenvolumens nicht überschreiten soll [52]. Ferner muss

beachtet werden, dass bei kurzen Säulen mit hoher Effizienz die Peaks mit sehr kleinen Peakhalbwertszeiten in rascher Folge eluieren können. Dies stellt eine große Herausforderung an den Detektor dar. Um einen Peak in seiner Gesamtheit darstellen zu können, sind 20 bis 30 Datenpunkte notwendig. In der klassischen HPLC reicht im Allgemeinen eine Datenaufnahmerate von 5 – 10 Hz (d.h. alle 200 bzw. 100 ms wird ein Datenpunkt aufgenommen) für diese Aufgabe aus. Die meisten Detektoren des vergangenen Jahrzehnts waren deshalb nicht auf höhere Datenraten ausgelegt. Abbildung 3-2. zeigt die theoretisch notwendige Datenaufnahmerate abhängig von der Säuleneffizienz und der Retentionszeit der Peaks. Man kann erkennen, dass im Einsatzbereich der UHPLC in etwa um den Faktor 5 – 10 (ca. 50Hz) höhere Datenaufnahmeraten als bei der HPLC notwendig sind und deshalb auch neue, schnellere Detektoren eingesetzt werden müssen.

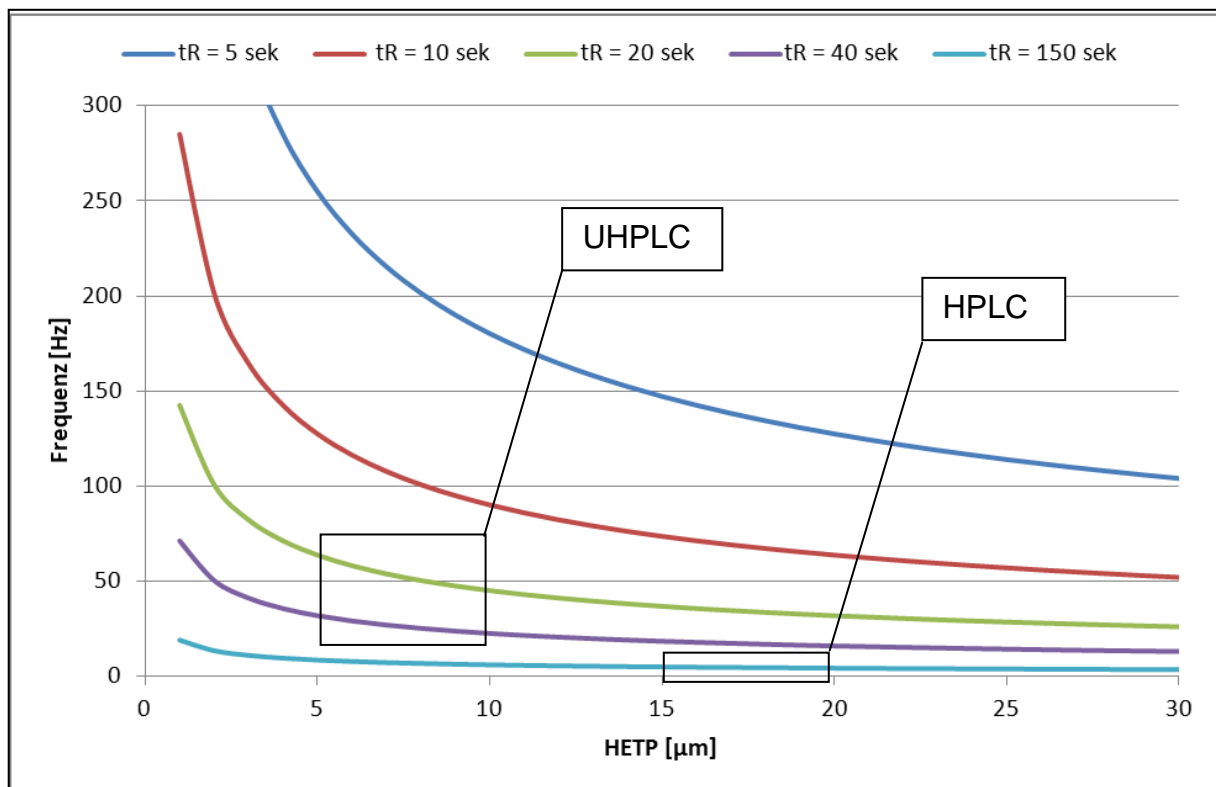


Abb. 3-2.: Theoretische Datenaufnahmeraten errechnet nach Gl. 21 [52] für 30 Datenpunkte pro Peak und eine Säulenlänge von 50mm.

$$F_{[Hz]} = \frac{D}{\sqrt{\frac{5,54 \cdot 10^{-6}}{L}} \cdot \sqrt{H} \cdot t} \quad (\text{Gl. 21})$$

$F_{[Hz]}$ = Datenaufnahmerate in Hz

D = Anzahl der Datenpunkte pro Peak

L = Länge der Säule in m

H = Trennstufenhöhe in μm

t = Retentionszeit in sek

3.2. Fused-core Partikel

Eine relativ neue Entwicklung im Bereich der schnellen HPLC stellt die fused-core Partikel Technologie dar. Sie bestehen aus einem festen Kern mit einem Durchmesser von $1,7\ \mu\text{m}$, der von einer $0,5\ \mu\text{m}$ dünnen, porösen Kieselgelschicht ummantelt ist [Abb. 3-3.]. Aufgrund dieses Aufbaus wird bisweilen die Bezeichnung Halo-Partikel verwendet. Sie sollen die Trennleistung der sub- $2\text{-}\mu\text{m}$ Säulen erreichen, allerdings auf herkömmlichen HPLC-Geräten eingesetzt werden können [50].

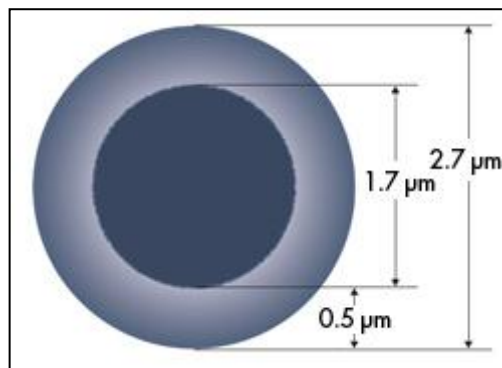


Abb. 3-3.: Aufbau eines fused-core Partikels. Der Kern ist fest, die Schale ist porös (aus <http://www.mac-mod.com/pb/halo-pb.html>).

Nach außen erscheinen die Halo-Partikel im Prinzip, wie $3\ \mu\text{m}$ große poröse Partikel der klassischen HPLC. Der aufzuwendende Druck ist demnach ähnlich hoch. Der spezielle Aufbau der Partikel ermöglicht es jedoch den C-Term der Van-Deemter-Gleichung (Gl. 10) zu verkleinern. Da die mobile Phase nur in die äußere Hülle, nicht aber in den festen Kern eindringt, kann die Stagnation minimiert werden. Der unerwünschte Aufenthalt der Analyten in den Poren der stationären Phase, welcher zu einer unnötigen Bandenverbreiterung führt, wird somit ebenfalls verkleinert. Die Van-Deemter-Kurve steigt deswegen nach dem Minimum nicht so steil an, sodass auch höhere Flussraten möglich sind, ohne die Trennleistung zu verschlechtern. In der Realität wird die angestrebte Trennleistung der sub-2-micron Partikel nicht erreicht. Sie liegt zwischen der von $3\ \mu\text{m}$ und $1,8\ \mu\text{m}$ Partikeln [50].

Obwohl diese Technologie sehr vielversprechend ist und viel umforscht wird [53-56], hat sie noch nicht den Einzug in die Routineanalytik der großen Arzneibücher gehalten.

3.3. Monolithische Säulen

Diese nicht partikelbasierte Technologie ist in den 80er und 90er Jahren des letzten Jahrhunderts entwickelt worden und sie wird von Merck® als erstem Anbieter ab dem Jahr 2000 kommerziell vertrieben. Grundlagenforschung auf diesem Gebiet wurde von mehreren Arbeitskreisen betrieben [5], es waren aber Nakanishi et al., die als erste das Sol-Gel-Verfahren entwickelten mit dem sich monolithische Kieselgelsäulen herstellen ließen [57-59]. Durch diesen speziellen Prozess, welcher auf Hydrolyse und Polykondensation von Alkoxysilanen in Anwesenheit von wasserlöslichen Polymeren basiert, erhalten die Monolithen eine bimodale, schwammähnliche Struktur aus Makro- und Mesoporen [Abb. 3-4.].

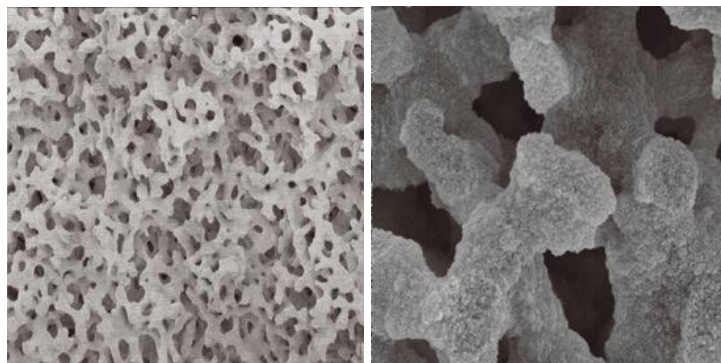


Abb. 3-4.: Aufbau eines Monolithen. Links sieht man die Makroporen, ein schwammartiges Grundgerüst. Rechts ist die feinporige Struktur der Mesoporen zu sehen, durch die eine sehr große Oberfläche erhalten wird. (aus at.vwr.com/app/catalog)

Obwohl durch das Herstellungsverfahren die Porengröße variiert werden kann, ist ein durchschnittlicher Durchmesser von 2 μm für die Makroporen am weitesten verbreitet. Die totale Porosität des Grundgerüsts beträgt dabei etwa 80% [60]. Dies erlaubt sehr hohe Flußraten (bis 9,9 ml/min) ohne dabei einen hohen Rückdruck, wie bei partikelbasierten Säulen zu erzeugen, weshalb auch der Einsatz in klassischen HPLC Instrumenten möglich ist [4]. Für die hohe Trennleistung sind die 13 nm kleinen Mesoporen verantwortlich. Abbildung 3-4. zeigt die durch sie entstehende feinporige Struktur mit einer sehr großen Oberfläche von 300m²/g Säulenmaterial, die eine hohe Bodenzahl bietet.

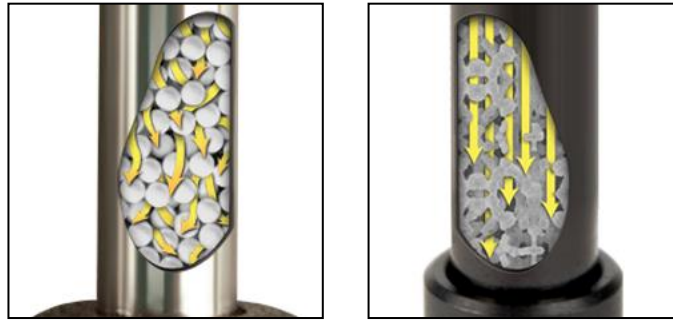


Abb. 3-5.: Durchfluß der mobilen Phase durch eine gepackte Säule (links) und durch eine monolithische Säule (rechts) (www.phenomenex.com)

Die mobile Phase durchläuft die schwammartige Struktur des Säulenbettes „geordnet“ [Abb. 3-5.]. Dadurch wird der Mehrwegseffekt (Term A in Gl. 10) deutlich verringert. Zusätzlich lässt das weitgehende Fehlen von Bereichen mit stagnierender mobiler Phase (Term C·u in Gl. 10) die Trennleistung auch bei sehr hohen Flußraten nur wenig absinken [61].

Diese bereits gut charakterisierte [4, 5, 8, 60, 62] und darüber hinaus kostengünstige Technik ist ideal für den Einstieg in die schnelle HPLC ohne neue, teure Geräte geeignet. In seiner Dissertationsschrift beschreibt Sami El-Deeb [4] ein einfaches Schritt-für-Schritt Konzept für den Methodentransfer von partikelbasierten auf monolithische Säulen und für die Entwicklung neuer monolithischer Methoden.

Es soll an dieser Stelle nicht unerwähnt bleiben, dass sich beim Einsatz von Monolithen zwar die Analysenzeit, nicht aber der Lösungsmittelverbrauch verringert, denn eine einminütige Analyse mit 9,9 ml/min verbraucht annähernd genauso viel mobile Phase, wie 10 Minuten mit 1,0 ml/min.

Eine Möglichkeit den Verbrauch dennoch zu reduzieren bietet das sogenannte *Solvent Recycling*, also die Wiederverwendung der mobilen Phase. In der Theorie wird davon ausgegangen, dass die injizierte Menge eines Analyten, bezogen auf die absolute Menge der mobilen Phase (z.B. 1,0 l) praktisch vernachlässigbar ist und die mobile Phase auch ohne Aufreinigung wieder dem System zugeführt, also recycelt werden kann [63]. Voraussetzung dafür ist eine konstante Homogenisierung der „verunreinigten“ mobilen Phase und ein automatisches Setzen des Detektorsignals auf null vor Beginn der nächsten Analyse. Abreu et al. [64] zeigten in ihrer Arbeit jedoch, dass diese Vorgehensweise schnell zu einem signifikanten Anstieg des

Detektorrauschens und schon nach wenigen Recyclingzyklen zu deutlichen Fehlern bei der Quantifizierung führt.

Eine weitere Möglichkeit den Lösungsmittelverbrauch zu verringern wäre der Einsatz von Säulen mit kleinerem Durchmesser. Auf diese Weise könnten die gleichen linearen Fließgeschwindigkeiten bei geringerem Volumenfluss erreicht werden. Einen Nachteil bilden aber die kleineren Injektionsvolumina, die durch das kleinere Volumen des chromatographischen Betts notwendig sind. Mit kleineren Injektionsvolumina sinkt aber gleichzeitig die Präzision, was in der Analytik unerwünscht ist.

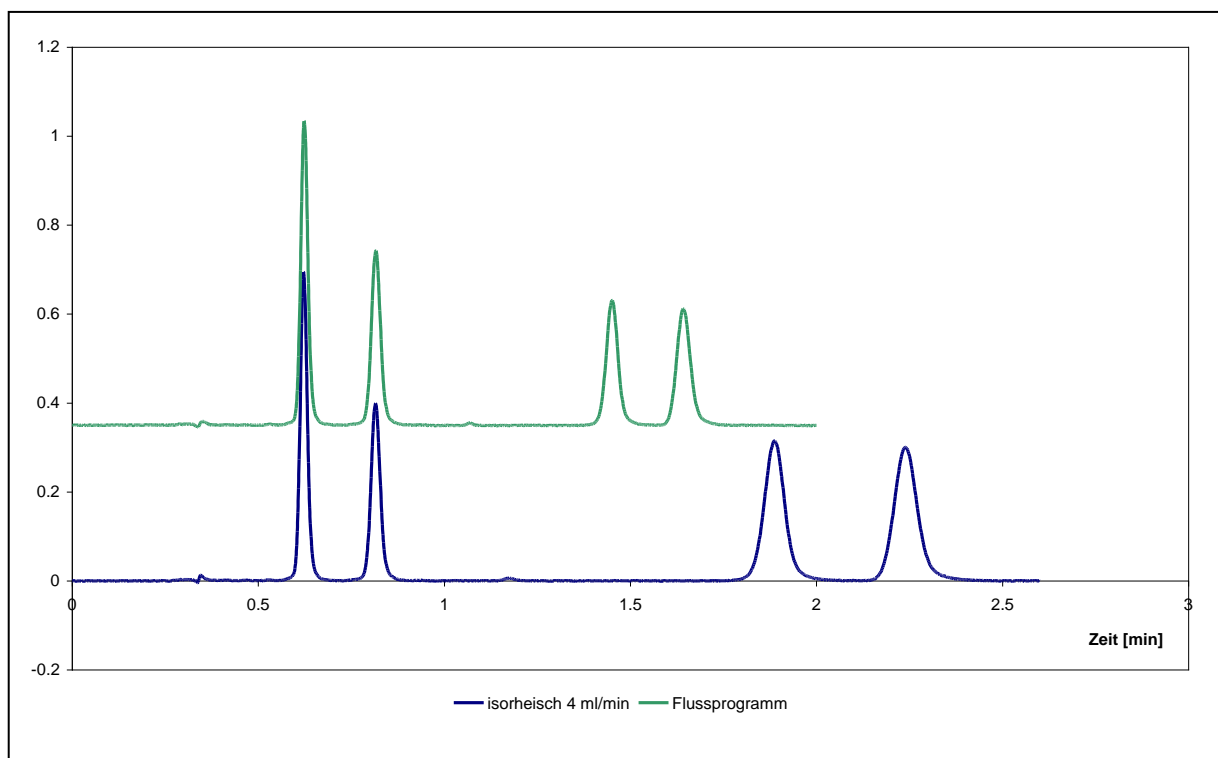


Abb. 3-6.: Auswirkung eines Flussprogramms auf die relative Retention. Das untere Chromatogramm wurde bei konstanter Flussrate (isorheisch) von 4,0 ml/min aufgenommen. Für das obere Chromatogramm wurde die Fließgeschwindigkeit bis 0,9 min auf 4,0 ml/min und ab 1,0 min auf 8,0 ml/min eingestellt.

3.3.1. Das Flussratenprogramm (= Flussprogramm)

Die relativ freie Wahl der Fließgeschwindigkeit beim Einsatz von Monolithen eröffnet neue Möglichkeiten zur Optimierung von chromatographischen Trennungen. Bei der klassischen HPLC kann durch Einsatz der Gradientenelution eine Analyse erheblich verkürzt werden. Die relative Retention α kann verkleinert werden indem die Elutionskraft (Fließmittelstärke) der mobilen Phase erhöht wird. In der Umkehrphasenchromatographie erreicht man das durch Erhöhung des organischen

Anteils, um die Polarität der mobilen Phase zu verringern. Dadurch erreichen Substanzen, welche ansonsten erst spät eluiert würden, den Detektor deutlich früher. Der Vorteil der Gradientenelution ist gleichzeitig auch ihr Nachteil. Die Zusammensetzung des Fließmittels muss vor der nächsten Analyse einer Serie wieder auf ihr Ausgangsniveau gebracht (=equilibriert) werden. Während der Equilibrierung muss das gesamte System samt Säule mehrere Minuten lang mit dem ursprünglichen Fließmittel gespült werden, bevor die nächste Analyse gestartet werden kann.

Beim Einsatz von Monolithen ist eine Gradientenelution nicht nötig. Hier kann durch Erhöhung der Flussrate auch die Veränderung der relativen Retention erreicht werden [Abb. 3-6.].

In der klassischen HPLC konnte der Einsatz eines Flussprogramms nicht sinnvoll umgesetzt werden, da die Fließgeschwindigkeit aus zwei Gründen nur in einem sehr eingeschränkten Bereich von 0,1 – 2,0 ml/min eingestellt werden kann. Zum einen, weil die Trennleistung sonst rapide sinkt und zum anderen, weil der Druck zu stark ansteigt. Die Monolithen hingegen erlauben im analytischen Maßstab Fließgeschwindigkeiten von bis zu 9,9 ml/min.

Um eine konstante Flussrate von einem Flussprogramm sprachlich abzugrenzen, wurde von uns der Begriff „isorheische Elution“ aus der Gaschromatographie [65] entlehnt und bei den monolithischen Methoden eingeführt. Auf diese Weise steht im Sinne einer einheitlichen Nomenklatur bei den Monolithen die isorheische Elution gegenüber einem Flussprogramm wie die isokratische einer Gradientenelution in der klassischen HPLC gegenüber steht.

Der große Vorteil eines Flussprogramms gegenüber einer Gradientenelution ist der Wegfall der Equilibrierung, da die Fließmittelzusammensetzung während der gesamten Analyse konstant bleibt. Innerhalb einer Analysenserie muss nach jedem Lauf lediglich die Fließgeschwindigkeit auf den Ausgangswert eingestellt werden und der nächste Lauf kann beginnen. Des Weiteren muss bei der Methodenentwicklung nicht mehr darauf geachtet werden, ob die Analyten in den verschiedenen Zusammensetzungen des Fließmittels löslich sind.

3.3.2. Einfluss des Flussratenprogramms auf die Präzision

Die Gradientenelution ist bereits gut charakterisiert worden und heute weiß man, dass die Präzision durch sie nicht nachteilig beeinträchtigt wird [66]. Für das

Flussprogramm sind bislang keine Untersuchungen diesbezüglich durchgeführt worden. Sie sind aber sehr wichtig, um zu entscheiden, ob es in der Routineanalytik eingesetzt werden kann oder nicht.

Um die Fehlerkomponente, die durch das Flussprogramm eingebracht wird zu bestimmen, wurden Daten für die Wiederholpräzision gesammelt und ausgewertet. Als Referenzmethode wurde eine, aus früheren Arbeiten [26, 61] hinsichtlich Nachweis-, Bestimmungsgrenze, Richtigkeit und Wiederfindung gut bekannte und validierte generische Methode eingesetzt.

3.3.2.1. Methode und Durchführung der Testung

Ein aus zwei oralen Antidiabetika, zum einen *Glibenclamid*, einem Sulfonylharnstoffderivat der zweiten Generation und zum anderen *Glimepirid*, einem Sulfonylharnstoffderivat der dritten Generation, sowie zweier ihrer *Abbauprodukte* (*a* und *b*) bestehendes Gemisch (=Testgemisch) wurde in Phosphatpuffer ($pH = 7$) und Acetonitril (20:80 v/v) gelöst. Als mobile Phase diente eine Mischung aus Phosphatpuffer ($pH = 3$) und Acetonitril (55:45 v/v). Das Testgemisch wurde auf einer 100mm · 4,6mm Chromolith Performance RP-18e Säule analysiert.

Zuerst wurde das Testgemisch im isorheischen Modus bei 4,0 ml/min [Abb. 3-6.] hinsichtlich der Präzision untersucht. Anschließend wurde ein einfaches Flussprogramm verwendet, welches die Fließgeschwindigkeit nach 0,9 min von 4,0 auf 8,0 ml/min steigert [Abb. 3-7a.]. Als letztes wurde ein komplexes Flussprogramm [Tab. 3-1.] angewendet, um zu überprüfen, inwiefern die Präzision beeinflusst wird, wenn die Pumpe den Fluss steigert während eine Substanz eluiert [Abb. 3-7b.].

Tab. 3-1.: Flussratenprogramm.

Zeit [min]	Flussrate [ml/min]
0 – 0,6	5,0
0,7	6,0
0,8 – 1,3	9,0
1,4 – 1,7	9,9

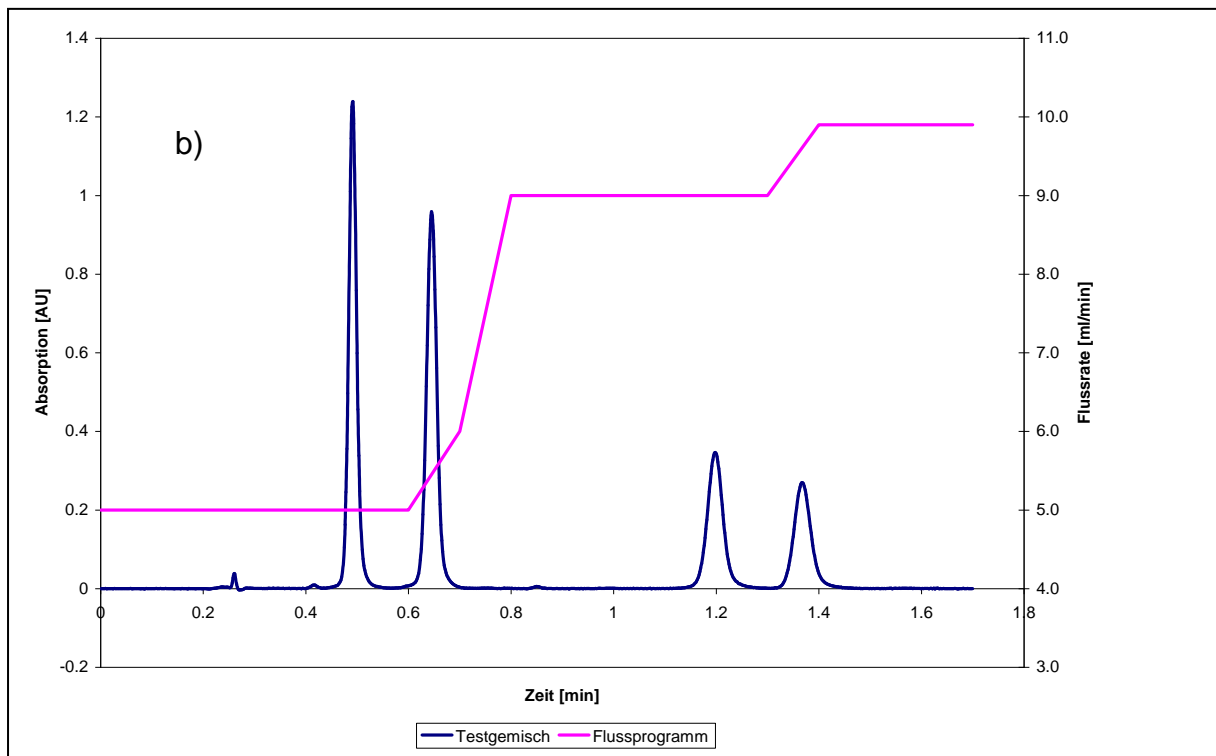
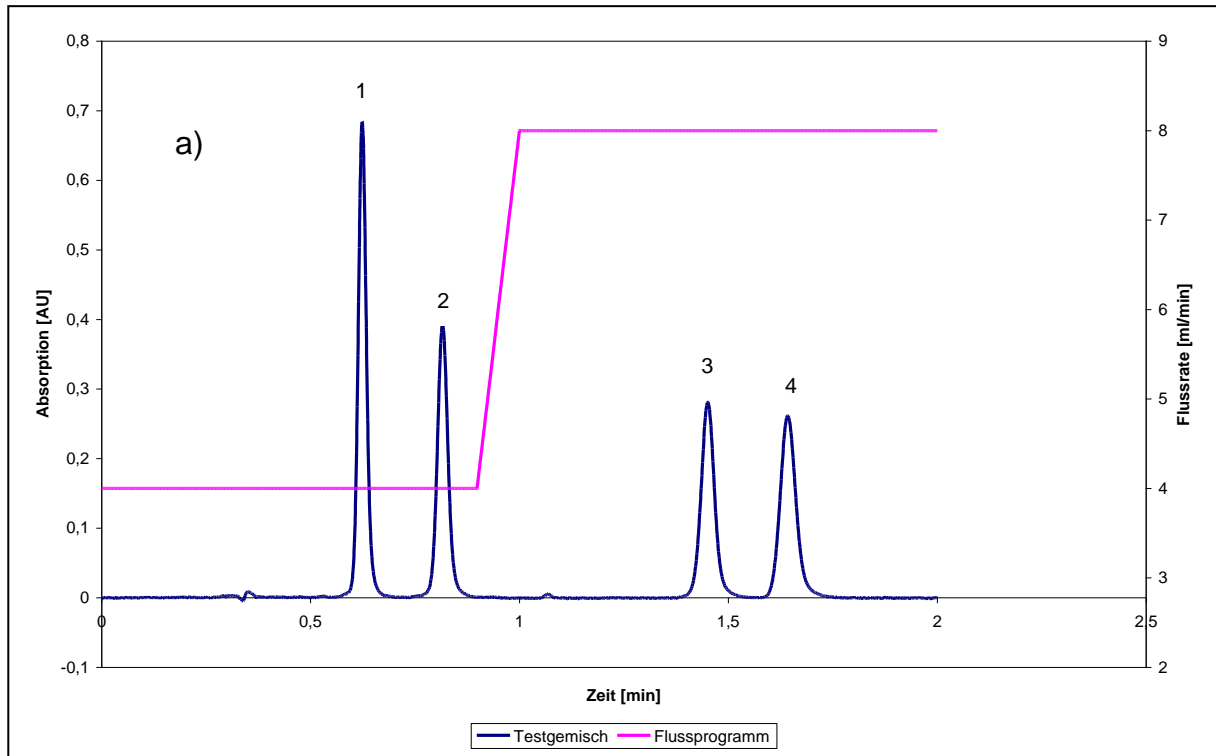


Abb. 3-7.: Chromatogramm a) zeigt ein einfaches Flussprogramm. Chromatogramm b) zeigt das Flussprogramm mit mehreren Flussratenstufen aus Tabelle 3-1. Die Änderung der Flussrate erfolgt zwei Mal während eine Substanz eluiert. Die Reihenfolge der Substanzen ist: Abbauprodukt a (1), Abbauprodukt b (2), Glibenclamid (3), Glimepirid (4).

3.3.2.2. Ergebnisse der Testung

Die isorheische Serie ($n = 20$) zeigte erwartungsgemäß durchweg eine sehr gute Wiederholpräzision für die Peakflächen (area under the curve = AUC) und Retentionszeiten (t_R) [Tab. 3-2a.] und bestätigte damit die Angaben der Literatur [4 und darin zitierte Literatur].

Tab. 3-2.: Wiederholpräzision der Peakflächen und Retentionszeiten bei isorheischer Elution a) mit 4,0 ml/min und b) mit 8,0 ml/min (jeweils $n = 20$).

a)	RSD _{AUC} %	RSD _{t_R} %
Abbauprodukt a	0,178	0,036
Abbauprodukt b	0,211	0,000
Glibenclamid	0,198	0,152
Glimepirid	0,235	0,072
b)		
Abbauprodukt a	0,333	0,134
Abbauprodukt b	0,349	0,152
Glibenclamid	0,433	0,063
Glimepirid	0,372	0,322

Bei dem Einsatz des einfachen Flussprogramms ($n = 20$) wurde insgesamt ebenfalls eine gute Wiederholpräzision für AUC und t_R ermittelt [Tab. 3-3.], allerdings zeigte sich bei den Substanzen, welche mit 8,0 ml/min Flussrate eluierten, eine kleine Verschlechterung der Präzision. Obwohl sie nicht bedenklich war, bot sie trotzdem einen Ausgangspunkt für weitere Nachforschungen. Es wurde eine isorheische Serie ($n = 20$) mit 8,0 ml/min durchgeführt, um sicherzustellen ob die schlechtere Präzision auf das Flussprogramm, oder aber auf die hohe Flussrate zurückzuführen sei. Bei dieser Fließgeschwindigkeit verschlechterte sich die Präzision bei allen vier Substanzen [Tab. 3-2b.].

Tab. 3-3.: Wiederholpräzision der Peakflächen und Retentionszeiten bei dem einfachen Flussprogramm ($n = 20$).

	RSD _{AUC} %	RSD _{t_R} %
Abbauprodukt a	0,198	0,061
Abbauprodukt b	0,250	0,036
Glibenclamid	0,392	0,110

Glimepirid	0,499	0,331
-------------------	-------	-------

Für die Untersuchung des komplexeren Flussprogramms [Tab. 3-1.] wurden an zwei aufeinanderfolgenden Tagen fünf Serien (an einem Tag $n = 20$ und am nächsten viermal $n = 10 \rightarrow n = 40$) analysiert, sodass insgesamt eine Datenzahl von 60 Läufen für die Auswertung zur Verfügung stand. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3-4. zusammengefasst. Sowohl das Abbauprodukt a, als auch das Glimepirid eluierten während die Pumpe die Flussrate veränderte [Abb. 3-7b.].

Tab. 3-4.: Wiederholpräzision und Mehrtagesstandardabweichung der Peakflächen und Retentionszeiten bei dem komplexen Flussprogramm.

	RSD_{AUC}% (Wiederholpräzision)						Intralabor RSD_{AUC}%
	Serie 1 (n=20)	Serie 2 (n=10)	Serie 3 (n=10)	Serie 4 (n=10)	Serie 5 (n=10)	Serie 2-5 (n=40)	Serie 1-5 (n=60)
Abbauprodukt a	0,414	0,327	0,113	0,209	0,376	0,399	0,648
Abbauprodukt b	0,786	0,303	0,123	0,447	0,336	0,482	0,789
Glibenclamid	0,576	0,235	0,341	0,874	0,583	0,768	1,535
Glimepirid	0,705	0,412	0,165	0,482	0,606	0,867	1,871
	RSD_{t_R}% (Wiederholpräzision)						Intralabor RSD_{t_R}%
	Serie 1 (n=20)	Serie 2 (n=10)	Serie 3 (n=10)	Serie 4 (n=10)	Serie 5 (n=10)	Serie 2-5 (n=40)	Serie 1-5 (n=60)
Abbauprodukt a	0,222	0,462	0,000	0,460	0,000	0,326	1,042
Abbauprodukt b	0,363	0,534	0,293	0,801	0,402	0,782	1,348
Glibenclamid	0,383	0,398	0,000	0,583	0,447	0,871	2,076
Glimepirid	0,335	0,036	0,000	0,056	0,032	0,827	2,147

Bei der in Tabelle 3-4. aufgeführten Intralabor-Standardabweichung wurde lediglich an unterschiedlichen Tagen gemessen. Operator, Instrument und die Probe blieben gleich. Erneut kann hier insgesamt von einer guten Präzision gesprochen werden. Es fällt allerdings wieder die Verschlechterung bei den Substanzen auf, die mit mehr als 7,0 ml/min eluieren. Besonders deutlich wird es bei Betrachtung der Mehrtagesstandardabweichung. Durch die zunehmende Streuung der Einzelvarianzen ergibt sich eine Gesamtstandardabweichung für die AUC von Glibenclamid und Glimepirid von mehr als 1,5% und für ihre t_R sogar mehr als 2%.

3.3.2.3. Bewertung und Interpretation der Ergebnisse

Die Untersuchungen haben ergeben, dass die Präzision bei Anwendung eines Flussprogramms innerhalb einer Serie durchweg positiv bewertet werden kann. Vergleicht man mehrere Serien miteinander wird deutlich, dass die Werte stärker

streuen, insbesondere bei den schnell eluierenden ($>7,0$ ml/min) Substanzen. Die Verschlechterung der Präzision kann allerdings nicht mit dem Flussprogramm erklärt werden. Zum einen trat sie auch in schnellen isorheischen Läufen (8,0 ml/min) auf und zum anderen gab es bei dem komplexeren Flussprogramm auch bei den Substanzen, die während eines Flussratenwechsels eluierten keine weitere Verschlechterung. Ein Flussprogramm hat also offensichtlich keinen Einfluss auf die Präzision und kann in der Routineanalytik eingesetzt werden. Es bleibt jedoch die zunehmende Streuung bei höheren Flussraten. Als mögliche Ursache wurde nach Ausschluss des Flussprogramms die Pumpe selbst in Betracht gezogen. Gestützt wurde diese Vermutung durch nicht korrekte AUC und t_R -Verhältnisse.

Verdoppelt man die Fließgeschwindigkeit, so sollte sich theoretisch die Retentionszeit halbieren, da die mobile Phase das chromatographische Bett doppelt so schnell durchläuft. Ebenso sollte sich die Peakfläche halbieren, da sich der Analyt nur halb so lange in der Durchflussszelle befindet.

Bei der Verdopplung der Geschwindigkeit von 2,0 ml/min (isorheisch) auf 4,0 ml/min (isorheisch) wurden die Peakflächen und Retentionszeiten, wie erwartet halbiert. Bei einer erneuten Verdopplung, dieses Mal von 4,0 auf 8,0 ml/min ergaben sich aber deutliche Abweichungen [Tab. 3-5.]. Ein solches Verhalten deutet stark auf eine unzureichende Leistung der Pumpe bei hohen Flussraten hin. Zum Nachweis ist das Pumpensystem einem klassischen Qualifizierungstest unterzogen worden. Dafür wurde die HPLC-Säule durch eine Teflonkapillare ersetzt, durch die anschließend Wasser hindurch gepumpt und am Detektorauslass in einem Messkolben aufgefangen und ausgewogen wurde.

Tab. 3-5.: Bei niedrigen Flussraten verhalten sich Peakflächen und Retentionszeiten wie erwartet (oben). Bei hohen Flussraten (unten) hingegen nicht. Das deutet auf eine unzureichende Leistung der Pumpe hin.

2,0 → 4,0 ml/min	Soll $t_{R4,0} : t_{R2,0}$	Ist $t_{R4,0} : t_{R2,0}$	Soll $AUC_{4,0} : AUC_{2,0}$	Ist $AUC_{4,0} : AUC_{2,0}$
Abbauprodukt a	0,5	0,501	0,5	0,5
Abbauprodukt b	0,5	0,505	0,5	0,502
Glibenclamid	0,5	0,502	0,5	0,5
Glimepirid	0,5	0,504	0,5	0,502
4,0 → 8,0 ml/min	Soll $t_{R8,0} : t_{R4,0}$	Ist $t_{R8,0} : t_{R4,0}$	Soll $AUC_{8,0} : AUC_{4,0}$	Ist $AUC_{8,0} : AUC_{4,0}$
Abbauprodukt a	0,5	0,522	0,5	0,521

Abbauprodukt b	0,5	0,524	0,5	0,524
Glibenclamid	0,5	0,535	0,5	0,534
Glimepirid	0,5	0,534	0,5	0,535

Bei der klassischen HPLC wird typischerweise nur bei einer Fließgeschwindigkeit von 1,0 ml/min geprüft [33]. Aus gegebenem Anlass haben wir diesen Test aber bei verschiedenen Flussraten durchgeführt, um die Pumpleistung, vor allem im höheren Bereich beurteilen zu können [Tab 3-6.].

Tab. 3-6.: Die Richtigkeit des Volumenstromes sinkt mit steigender Flussrate. Die Toleranz von $\pm 3,0\%$ [67] wird ab 7,0 ml/min überschritten (rot gekennzeichnet). Das tatsächliche Volumen stellt einen Mittelwert aus je 10 Messungen dar.

Flussrate [ml/min]	Erwartetes Volumen nach 10 min [ml]	Tatsächliches Volumen nach 10 min [ml]	Abweichung vom tatsächlichen Volumen [%]
1,000	10,00	9,97 \pm 0,01	-0,290
2,000	20,00	19,94 \pm 0,02	-0,300
4,000	40,00	39,76 \pm 0,09	-0,600
6,000	60,00	58,81 \pm 0,20	-1,983
7,000	70,00	67,82 \pm 0,39	-3,114
8,000	80,00	77,22 \pm 0,47	-3,475
9,000	90,00	86,75 \pm 0,56	-3,611

Tatsächlich stellte sich heraus, dass die Pumpe bei Flussraten von 7,0 ml/min und mehr nicht richtig funktionierte. Sie förderte die mobile Phase langsamer als angegeben. Das Ergebnis bestätigte die Vermutung, dass nicht das Flussprogramm, sondern die Pumpe selbst für die schlechtere Präzision bei höheren Flussraten verantwortlich war. Auf der anderen Seite verdeutlicht das Ergebnis, dass das Pumpensystem beim Einsatz von Monolithen über den gesamten Flussratenbereich qualifiziert werden muss, um Schwächen zu erkennen, die in der klassischen HPLC nicht relevant waren, weil dort Flussraten von max. 2 ml/min eingesetzt wurden. Wahrscheinlich werden viele Pumpen aus der „prämonolithischen“ Zeit bei hohen Flussraten schlechtere Ergebnisse zeigen, da sie für gepackte Säulen und nicht für diese Geschwindigkeiten entwickelt wurden.

In zwei kürzlich veröffentlichten Arbeiten von Pous-Torres et al. [60, 68] demonstrieren die Autoren zudem ausführlich die Auswirkungen eines bereits in den

1980er Jahren von Foley et al. [69] beschriebenen Phänomens, beim Einsatz von hohen Flussraten in Monolithen. In einem „idealen“ chromatographischen System sind sowohl die mobile Phase, als auch die stationäre Phase und die Säulenwand unabhängig vom Druck nicht komprimierbar. Jedoch sind in der Praxis die chromatographischen Systeme nicht „ideal“. Mobile Phasen werden abhängig vom angelegten Druck komprimiert (reine Lösungsmittel anders als Gemische), ebenso wird die Säulenwand und Füllung durch Druck leicht verformt [60, 68, 69]. Die Reibungswärme, die beim Durchfließen der stationären Phase entsteht, trägt zusätzlich zu einer Veränderung des linearen Strömungsprofils der mobilen Phase bei, so dass sich Retentionszeiten und folglich Peakflächen nicht wie erwartet verhalten. Beim Einsatz von Monolithen entsteht wegen der Makroporen zwar weniger Reibungswärme, aber dafür sind die PEEK Ummantelungen druckempfindlicher als Edelstahl. Sie können sich regelrecht „aufblähen“, was zu einem Abfall der linearen Geschwindigkeit und somit zu verlängerten Retentionszeiten, vor allem bei hoher Fließgeschwindigkeit, führt [68]. Die auf dieses nicht „ideale“ Verhalten zurückzuführenden Abweichungen, können laut Foley und Pous-Torres mittels entsprechender Korrekturfaktoren deutlich reduziert werden.

3.4. Zusammenfassung

Die schnelle HPLC ist sowohl unter wirtschaftlichen, als auch unter ökologischen Aspekten eine sehr sinnvolle Weiterentwicklung der HPLC. Es kann heute nicht mit Bestimmtheit vorausgesagt werden, welche der drei konkurrierenden Methoden (UHPLC, Fused-Core oder Monolithen) sich am Ende durchsetzen wird. Sicherlich bieten alle drei Vor- und Nachteile. Bei der UHPLC bekommt der Anwender hohe Trennleistung und kurze Analysenzeiten, muss dafür aber viel Geld in ein komplett neues UHPLC-Equipment investieren. Die Fused-Core-Technologie soll die gute Trennleistung der UHPLC auf klassischen HPLC-Geräten ermöglichen. Leider wird dieses Ziel heute noch nicht erreicht. Die monolithischen Säulen bieten dank ihres bimodalen Aufbaus (Makro- und Mesoporen) hohe Trennleistung selbst bei schnellen Flussraten, ohne dabei einen hohen Rückdruck zu generieren. Deswegen sind sie ebenfalls für klassische HPLC-Instrumente geeignet. Auch die Kopplung mehrerer Monolithen mittels Säulenkuppler ist wegen des geringen Rückdrucks bedenkenlos möglich, was die Trennleistung erheblich steigert. Zudem bieten sie mit dem Flussratenprogramm ein hervorragendes Werkzeug zur Methodenoptimierung ohne

die Fließmittelzusammensetzung ändern zu müssen. Es wurde in der vorgelegten Arbeit gezeigt, dass die mit Monolithen erreichbare sehr gute Präzision ($\text{RSD\%} < 1,0$) nicht signifikant von einem solchen Flussprogramm beeinflusst wird. Die bei höheren Flussraten aufgetretenen Abweichungen der Retentionszeiten und Peakflächen konnten auf ein natürliches Phänomen, das sogenannte nicht „ideale“ chromatographische Verhalten, und auf eine unzureichende Leistung des Pumpensystems zurückgeführt werden. Es sei an dieser Stelle noch einmal angemerkt, dass die Präzisionswerte trotz dieser widrigen Umstände immer noch mehr als gut waren. Dennoch lässt sich der Einfluss des nicht „idealen“ Verhaltens durch entsprechende Korrekturfaktoren reduzieren. Bei der Pumpleistung ist es schwieriger, denn das Problem kann zwar leicht erkannt, aber leider nicht leicht behoben werden. Viele ältere Pumpen können zwar auf Flussraten von über 9,0 ml/min eingestellt werden, erreichen diese Werte jedoch nicht ganz. Da sie aus einer Zeit stammen, als solche Flussraten in der Praxis nicht realisierbar waren, wurden sie für mehr als 2,0 ml/min gar nicht qualifiziert. Obwohl die Abweichungen teilweise über der allgemein anerkannten Toleranzgrenze von $\pm 3\%$ liegen, bleibt das Ergebnis weiterhin gut, weswegen die Pumpen weiterhin eingesetzt werden können. Nichtsdestoweniger sollten sich Anwender über diese Fehlerquelle bewusst sein und bei Einsatz von Monolithen ihre Pumpensysteme einer erweiterten Qualifizierung über den gesamten Flussratenbereich unterziehen. Um hohe Flussraten und den damit verbundenen Fehler zu umgehen und gleichzeitig mobile Phase zu sparen, wäre der Einsatz von Säulen mit geringerem Durchmesser denkbar. Allerdings würde es hier bedingt durch die kleineren Injektionsvolumina möglicherweise auch zu einer Verschlechterung der Präzision kommen. Es muss also im Einzelfall sorgfältig abgewogen werden, was die bessere Alternative ist.

4. Qualifizierung Analytischer Instrumente

4.1. Notwendigkeit der Qualifizierung

Arzneimittel sind Produkte von besonderer Güte, weswegen sie einer speziellen, standardisierten Überwachung bedürfen. Vor der Zulassung eines Arzneimittels muss dessen Wirksamkeit und Unbedenklichkeit in klinischen Studien nachgewiesen werden. Nach der Zulassung muss während der Herstellung, zum einen durch den Herstellungsprozess selbst und zum anderen durch eine Qualitätskontrolle permanent eine gleichbleibend hohe Qualität im Hinblick auf Identität, Reinheit und Gehalt des Arzneimittels sichergestellt werden. Deswegen sind in der pharmazeutischen Industrie alle Vorgehensweisen strikt reglementiert und unterliegen fortwährender Dokumentation. Damit die Chargenfreigabe durch die Sachkundige Person auf verlässlichen Daten beruht, müssen alle analytische Maßnahmen, Methoden und vor allem Geräte strengen formalen Kriterien genügen. Da analytische Geräte durch Verschleiß oder auch durch andere Faktoren Fehlfunktionen aufweisen können, die nicht sofort zu einem Totalausfall führen, sondern latent persistieren und systematische Fehler bewirken können, ist eine regelmäßige Überprüfung ihrer Leistungsfähigkeit von größter Wichtigkeit und muss deshalb auch als Grundvoraussetzung für eine hohe Integrität und Qualität der generierten Daten in der pharmazeutischen Analytik angesehen werden.

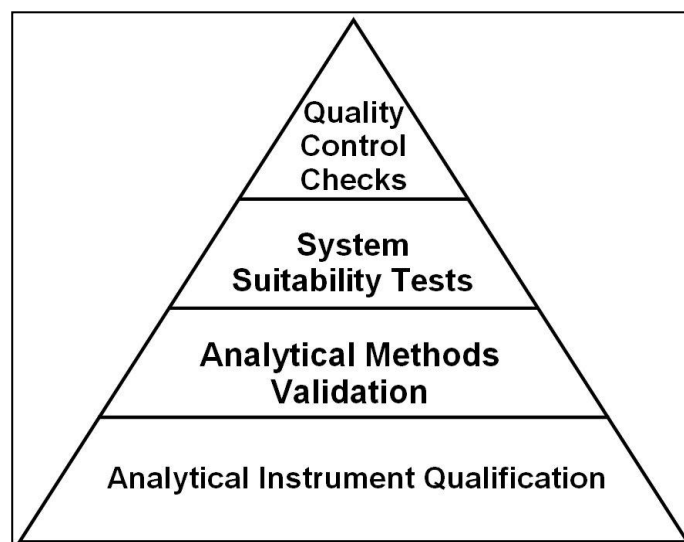


Abb. 4-1.: Das sogenannte „Dreieck der Qualität“ [9, 70] verdeutlicht, dass alle qualitätssichernden Maßnahmen auf der AIQ basieren.

Für größtmögliche Datenqualität benötigt man also zuverlässig arbeitende Geräte, auf denen validierte Methoden ausgeführt werden, die wiederum durch regelmäßige Systemeignungstests (siehe 4.4.2.4.) überprüft werden. Die eigentlichen Prüfungen der Qualitätskontrolle bilden schließlich die Spitze des Dreiecks [Abb. 4-1.].

4.2. Begriffe und Definitionen nach USP <1058>

In einem so streng regulierten Umfeld, wie der Pharmazeutischen Industrie ist eine einheitliche Nomenklatur nicht nur wünschenswert, sondern für eine präzise Verständigung (sowohl international als auch zwischen der pharmazeutischen Industrie und den Behörden) unerlässlich. Es wundert deswegen umso mehr, dass erst mit Veröffentlichung des Allgemeinen Kapitels <1058> der US Pharmakopöe (USP 31/NF 28, general chapter <1058>) im August 2008 eine Solche geschaffen wurde [9] Dieses Kapitel, welches zu einem großen Teil auf der Arbeit von Bansal et. al basiert [70], schlägt die folgende nomenklatorische Einteilung vor. Analytische Methoden, sowie die zu ihrem Durchführen und zum Auswerten der erhaltenen Daten benutzte Software werden *validiert*. Für die Gesamtheit der Hardware soll der Begriff *Qualifizierung* reserviert sein. Die bisweilen benutzte Bezeichnung *Verifizierung* wird gar nicht mehr verwendet, um Missverständnissen vorzubeugen. Zudem wurde der früher gebräuchliche Begriff *equipment* durch den bestimmteren Begriff *analytical instrument* ersetzt.

Unter der *analytischen Methodendvalidierung* ist also der formelle und dokumentierte Nachweis zu verstehen, dass eine analytische Methode für ihren Einsatzzweck geeignet ist und die an sie gestellten Anforderungen (z.B. Trennung eines Wirkstoffes von seinem Abbauprodukt) erfüllt [71].

Der dokumentierte Nachweis, dass ein analytisches Gerät über ein zur Durchführung seiner Aufgaben korrektes Design verfügt, dass es regelmäßig korrekt kalibriert, gewartet und getestet wurde, und dass es innerhalb der geforderten Spezifikationen arbeitet bezeichnete man früher als Gerätevalidierung/-qualifizierung, und heute nach <1058> USP als *Qualifizierung Analytischer Instrumente* (engl. Analytical Instrument Qualification = AIQ). Im Lifecycle Management eines Gerätes bildet die AIQ einen wichtigen Prozess, der dieses Gerät vom ersten Entwurf bis zu seiner Außerdienststellung begleitet.

Obwohl alle Kapitel der US Pharmakopöe, die eine Nummer größer als <999> besitzen, nur einen empfehlenden und keinen bindenden Charakter haben, wurde

das <1058> von der Pharmazeutischen Industrie sehr willkommen geheißen, da es außer den wichtigen nomenklatorischen Empfehlungen endlich eine von offizieller Seite regulierte Richtlinie zu der Strukturierung und akzeptierten Durchführung einer AIQ bildet.

Leider bietet das Europäische Arzneibuch selbst in der aktuellen Ausgabe 6.4 kein vergleichbares Kapitel zur Qualifizierung. In Kapitel 2.2.46 – Chromatographische Trennmethode heißt es nur kurz: „Die einzelnen Elemente der verwendeten Geräte müssen **qualifiziert sein und über** die für die „Prüfung auf Reinheit“ oder **die** „Gehaltsbestimmung“ **geforderte Leistungsfähigkeit verfügen**“.

4.2.1. Kategorien von analytischen Instrumenten

Die heutigen analytischen Abteilungen und Laboratorien verfügen über eine Vielzahl verschiedenster analytischer Instrumente, welche in ihrem apparativen Aufbau und in ihrer Funktion unterschiedlich komplex sind. Es wäre folglich wenig sinnvoll und zudem wissenschaftlich unangemessen alle Instrumente mit dem gleichen Aufwand zu qualifizieren [9]. Das Kapitel <1058> schlägt daher die Einteilung von analytischen Geräten nach ihrer Komplexität in drei Gruppen vor:

Kategorie A: Alle einfachen Gerätschaften, wie z.B. Magnetrührer, Verdampfer oder Zentrifugen, die keine Messfunktion besitzen und nicht kalibriert werden müssen. Die Funktionsprüfung erfolgt hier in der Regel nur visuell.

Kategorie B: Alle Geräte, die in irgendeiner Form Messwerte liefern, oder physikalische Größen, wie Druck, Temperatur, Feuchte, etc. kontrollieren und regelmäßig einer Kalibrierung bedürfen. Dies können z.B. Thermometer, Lichtmikroskope, variable Pipetten, analytische Waagen etc. sein. Die richtige Funktion wird hier in der Regel durch die Kalibrierung sowie die Überprüfung der vom Hersteller angegebenen Toleranzen gewährleistet.

Kategorie C: Alle Instrumente und computergestützten analytischen Systeme, mit anwendungsspezifischen Benutzervorgaben für Funktions- und Leistungsparameter. Solche Geräte sind z.B. UV/VIS-Spektrometer, IR- und NIR-Spektrometer, Röntgenfluoreszenzspektrometer, GC- und HPLC-Instrumente. Ihr korrektes Arbeiten wird durch Überprüfung der zuvor durch Hersteller und Benutzer spezifizierten

Funktions- und Leistungsparameter sichergestellt. Bei den recht komplexen Geräten der Kategorie C gehören bereits die Planung vor der Anschaffung (Anfertigung eines *Lastenhefts* durch den Anwender) und die Ausführung dieser Pläne (Anfertigung eines *Pflichtenhefts* durch den Hersteller) samt Installation zum Qualifizierungsprozess. Bei diesen Geräten soll deswegen die AIQ, wie im Folgenden ausgeführt, in ihrer Gesamtheit durchgeführt werden.

Für die Einteilung eines analytischen Instruments in eine der drei Kategorien gibt das Kapitel <1058> allerdings keine bindenden Vorgaben, da es bisweilen zu Überschneidungen, insbesondere zwischen B und C kommen kann. Die Behörden überlassen diese Entscheidung stattdessen der Fachkompetenz des jeweiligen Anwenders, welcher im Zweifelsfall sicherlich Kategorie C wählen wird.

4.2.2. Gliederung der AIQ – Das 4Q Konzept

Bei der Gliederung der AIQ greifen sowohl die USP, als auch andere Fachleute für Qualifizierung [9, 67, 70, 72-76] auf ein Konzept zurück, welches sich seit langer Zeit bewährt und als vorteilhaft erwiesen hat.

Dieses Konzept teilt den Qualifizierungsprozess in vier Teile auf, von denen die ersten beiden einmalig vor der Inbetriebnahme eines neuen Gerätes und die letzten beiden regelmäßig nach der Inbetriebnahme durchgeführt werden sollen.

4.2.2.1. Entwurfsqualifizierung (Design Qualification = DQ)

Diese erste Phase der Qualifizierung beginnt mit dem Wunsch eines Benutzers, ein neues analytisches Instrument für einen bestimmten Zweck zu erwerben. Der Benutzer muss unter Berücksichtigung des beabsichtigten Einsatzes einen Funktions- und Leistungsumfang, möglichst mit den gewünschten Toleranzen und Spezifikationen, für das Gerät definieren. Die Gesamtheit der Forderungen wird in einem *Lastenheft* niedergeschrieben und im englischsprachigen Raum als *user requirement specification (USR)* bezeichnet.

In bestimmten Fällen können Benutzer jedoch auf sogenannte COTS-Systeme (engl. commercial-off-the-shelf = Standardgerät „von der Stange“) zurückgreifen, welche bereits für gängige Anwendungen vorkonfiguriert sind (z.B. Standard HPLC-Anlage mit UV/VIS Detektor). In diesen Fällen muss der Benutzer lediglich sicherstellen, dass ein bestimmtes COTS-System seinen Anforderungen tatsächlich genügt. Der Hersteller übernimmt den Rest der DQ.

4.2.2.2. Installationsqualifizierung (Installation Qualification = IQ)

Mit Annahme eines Lastenheftes beginnt die zweite Phase der Qualifizierung vor der Inbetriebnahme des Gerätes. Der Hersteller geht auf die Wünsche des Anwenders ein und beschreibt in konkreter Form in einem *Pflichtenheft*, wie er die Anforderungen umsetzen will. Zusätzlich muss vor Auslieferung eines neuen Gerätes der Hersteller gemeinsam mit dem Anwender sicherstellen, dass der Aufstellungsort den Geräteanforderungen genügt, etwa wenn ein klimatisierter Raum oder spezielle Stromanschlüsse etc. benötigt werden. Dies wird im Pflichtenheft als *vendor-specified-environmental-requirements (VSER)* bezeichnet. Zur IQ zählen ferner der Transport zum, und alle Aufbauschritte am Aufstellungsort des Anwenders samt Anschluss an Rechner und/oder Netzwerksysteme. Abgeschlossen wird diese Qualifizierungsphase mit dem erstmaligen Einschalten des Gerätes und einer folgenden Erstdiagnose aller Komponenten und Anschlüsse durch den Techniker.

Obwohl DQ und IQ eigentlich nur einmal vor Inbetriebnahme durchgeführt werden müssen, kann es im Einzelfall nötig sein, sie teilweise zu wiederholen. Werden beispielsweise nachträglich zusätzliche Module, wie z.B. ein anderer Detektor für die HPLC Anlage angeschafft, so muss die DQ entsprechend abgeändert wiederholt werden. Wird ein Gerät an einen neuen Standort verlegt, muss die IQ im Hinblick auf die VSER ebenfalls nochmals durchgeführt werden, allerdings dann in der Regel vom qualifizierten Hauspersonal.

4.2.2.3. Funktionsqualifizierung (Operational Qualification = OQ)

Nach der erfolgreichen ersten Inbetriebnahme eines neuen Gerätes beginnt die Funktionsqualifizierung. In dieser Phase können fixe Parameter, welche sich während der Lebenszeit eines Gerätes nicht ändern, wie etwa Länge, Breite, notwendige Spannung etc., einmalig überprüft werden. Hauptsächlich dient die OQ aber zur Überprüfung der vom Benutzer geforderten bzw. vom Hersteller garantierten Funktionen. Der Anwender prüft und dokumentiert also, dass das gelieferte Gerät wie beabsichtigt funktioniert und zwar innerhalb der vorher festgelegten Spezifikationen. Die Durchführung kann entweder *modular* oder *holistisch* erfolgen. Bei einer modularen Prüfung werden die einzelnen Bauteile, wie z.B. Pumpe, Injektor, Detektor, etc. separat nacheinander getestet. Im holistischen Ansatz wird ein Gerät in seiner Gesamtheit, das heißt im normalen Betrieb geprüft. Für die OQ wird von Fachleuten die modulare Vorgehensweise bevorzugt, da ihrer Meinung nach auf diese Weise jede Baugruppe, ohne etwaige Störeinflüsse einer anderen untersucht

werden kann [67, 76]. Die OQ wird erstmalig direkt nach der IQ und danach jedes Mal nach größeren Reparaturen oder Systemmodifikationen (Austausch der Pumpe oder des Detektors usw.) durchgeführt.

4.2.2.4. Leistungsqualifizierung (Performance Qualification = PQ)

Den Abschluss der „4Q“ Reihe bildet die Leistungsqualifizierung. Sie wird in regelmäßigen Abständen, häufig halbjährlich oder seltener auch einmal im Jahr durchgeführt und sie soll einen dokumentierten Nachweis erbringen, dass ein Gerät konstant innerhalb der vom Benutzer für eine bestimmte Aufgabe definierten Spezifikationen arbeitet. Dabei ist es sinnvoll, die PQ nicht nur als eine immer wiederkehrende Aufgabe, sondern als einen fortlaufenden Prozess zu sehen, welcher das Gerät bis zu seiner Ausmusterung begleitet. Neben der regelmäßigen Überprüfung der Leistungsparameter gehören nämlich auch vorbeugende Wartung sowie Kalibrierungen in festen Zeitabständen zu der Gesamtheit der PQ.

Anders als bei der OQ wird bei der PQ die holistische Herangehensweise bevorzugt, gerade weil hier ein realistisches Abbild der Gesamtsystemleistung erhalten wird. Eine modulare Testung ist allerdings durchaus erlaubt.

Die Tatsache, dass die OQ und die PQ sowohl modular als auch holistisch durchgeführt werden können und zudem ähnliche Prüfparameter aufweisen, macht es sehr schwierig zu unterscheiden, wo die OQ aufhört und die PQ beginnt. Selbst AIQ-Fachleute [67, 70, 72-74] und die Aufsichtsbehörden [9, 77] legen sich nicht fest und geben zu, dass keine scharfe Abgrenzung existiert. Nichtsdestoweniger müssen beide Qualifizierungsphasen durchgeführt werden, da sie formal einem anderen Zweck dienen.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit sollen die DQ und IQ nicht weiter betrachtet werden, da sie nach einer korrekten Durchführung keinen weiteren Einfluss auf die fortlaufende Leistung eines Systems haben, und somit weder unter wissenschaftlichen noch unter ökonomischen Aspekten interessant sind. Daher ist ab hier mit Qualifizierung immer die OQ und PQ gemeint.

4.3. Schwächen der klassischen AIQ nach <1058>

In den vorangegangenen Abschnitten wurde dargestellt, warum die AIQ sehr wichtig für eine hohe Datenqualität ist und wie sich die Aufsichtsbehörden ihre Strukturierung wünschen. Bedenkt man, dass es bis 2008 keine offiziellen Vorgaben für eine

regulierte Qualifizierung gab, sollte man annehmen, dass die USP mit dem Kapitel <1058> der pharmazeutischen Industrie einen großen Schritt entgegen gekommen ist und deren Arbeit vereinfacht hat. Das ist aber nur teilweise richtig, denn auf den zweiten Blick erkennt man, dass in diesem Kapitel, bis auf die nomenklatorischen Neuerungen und die Einführung der Gerätekategorien, lediglich das zusammengefasst wurde, was bereits ohnehin in, nach GLP und GMP arbeitenden Laboratorien [67, 70, 72-74] gängige Qualifizierungspraxis gewesen ist. Leider definiert das USP immer noch nicht, welche Prüfungen im Einzelnen durchgeführt werden sollen. Auch von den AIQ-Experten kommen nur unverbindliche Vorschläge zu den überprüfbaren Parametern. Beide Parteien sind sich einig, dass der Anwender mit seiner Fachkenntnis diese festlegen und sinnvoll prüfen soll. Was zuerst sehr vernünftig klingt, bringt allerdings die Gefahr, dass der Anwender zu viel testet, aus Sorge weniger könnte den Behörden nicht reichen.

Ferner birgt die beschriebene periodische Durchführung der OQ und PQ Nachteile, die im Folgenden näher beschrieben werden sollen.

4.3.1. Schwächen im Hinblick auf die Datenqualität

Die Wiederholung der OQ nach größeren Reparaturen und die periodische PQ sollen gewährleisten, dass ein analytisches Instrument konstant innerhalb der gesetzten Spezifikationen arbeitet und somit kontinuierlich zuverlässige Ergebnisse als Basis für die Datenqualität liefert. Das Problem der periodischen Testung ist aber, dass die Testergebnisse nur einen „Schnappschuss“ der Systemleistung darstellen.

Wenn ein System die PQ besteht, wird von einer konstant guten Leistung zwischen beiden Testreihen ausgegangen und das Gerät gilt als qualifiziert. Problematisch wird es aber, wenn ein System die PQ nicht besteht. Da man nicht weiß wann der Fehler aufgetreten ist, müssen in diesem Fall alle mit diesem Gerät seit der letzten bestandenen PQ generierten Daten kritisch neu evaluiert und gegenüber den Behörden gerechtfertigt werden. Die empfohlene vorbeugende Wartung kann das Risiko eines Systemversagens zwar minimieren, ein solches Versagen aber nicht erkennen. Um die Ungewissheit zwischen zwei PQ-Testungen zu vermeiden wird in der pharmazeutischen Industrie oft ein bestandener *Systemeignungstest* als Indikator für ein fehlerfreies Arbeiten genutzt. In diesem Zusammenhang bezeichnen Bedson und Rudd in ihrem Manuskript die periodische PQ bei dieser Vorgehensweise als „initial PQ“ und die Systemeignungstests als „ongoing PQ“ [67]. Andere Quellen [74,

75] schlagen einfache, nah an der Laborroutine angelegte Methoden vor, um die Systemleistung in sehr kurzen Zeitabständen, etwa auf wöchentlicher Basis ohne viel Aufwand zu überprüfen. Die Systemeignungstests werden von allen Experten und auch von den Behörden als sehr nützliches Werkzeug zur begleitenden Informationsgewinnung gesehen. Jedoch, so die einstimmige Meinung, können und sollen diese Tests keineswegs die periodische PQ ersetzen.

4.3.2. Schwächen aus wirtschaftlicher Sicht

Die Gerätequalifizierung stellt auch einen beträchtlichen wirtschaftlichen Posten dar, der grob in drei Teile gegliedert werden kann.

Als erstes ist die Durchführung der Qualifizierung selbst zu nennen. Für sie muss immer Personal bereitgestellt werden, welches nicht nur analytisch geschult, sondern auch mit den regulatorischen Anforderungen vertraut ist. Dieses Personal steht während der Qualifizierung nicht für andere Aufgaben zur Verfügung. Alternativ kann ein externes Unternehmen, welches sich auf die OQ/PQ spezialisiert hat für solche Prüfungen beauftragt werden. Diese Lösung bindet zwar kein Hauspersonal, allerdings muss der externe Anbieter teuer bezahlt werden.

Den zweiten und bei weitem größeren Kostenfaktor macht die Ausfallzeit des Gerätes aus. Bei den pharmazeutischen Unternehmen sind die analytischen Systeme ständig im Einsatz. Fällt ein System qualifizierungsbedingt aus, so kann es nicht für seine eigentlichen Aufgaben genutzt werden und dies bedeutet in anderen Bereichen des Betriebes ebenfalls stillstand. Besonders wenn externe Unternehmen die Qualifizierung durchführen, werden zweckmäßigerweise alle Geräte geprüft weswegen dafür nicht selten mehrere Tage veranschlagt werden.

Abbildung 4-2. zeigt, dass beinahe in 50% der Fälle ein Nutzungsausfall der HPLC – Geräte, allein aufgrund einer Routinequalifizierung 2 bis 3 Tage, und in manchen Fällen sogar mehr als 5 Tage beträgt. In dieser Zeit muss, falls keine Ersatzgeräte zu Verfügung stehen, die Analytik kostspielig ausgelagert werden.

Als letztes sind die Kosten zu nennen, die als Folge eines eventuellen Nichtbestehens der PQ entstehen. Die dadurch notwendige Reevaluierung der Daten führt nicht nur zu dem erwähnten Verlust an Datenqualität, sondern auch zu immensen Kosten und im ungünstigsten Fall zum Rückruf ganzer Chargen.

Bei dem Festsetzen von akzeptablen Zeitintervallen zwischen den PQ Prüfungen ist es deshalb eine große Herausforderung einen Kompromiss zwischen Kosten, Arbeitsaufwand und Systemverfügbarkeit auf der einen Seite, und einem Systemversagen und den damit verbundenen Kosten auf der anderen zu schaffen.

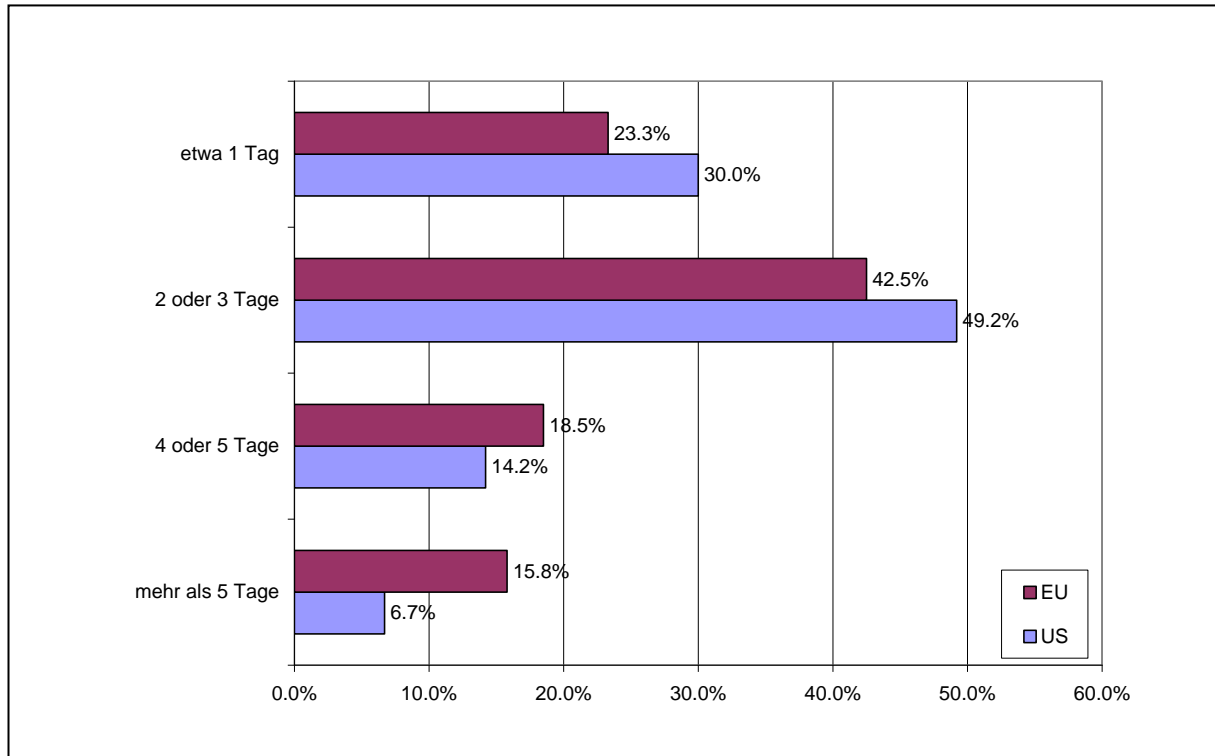


Abb. 4-2.: Auswertung der Zeitschrift LC-GC in Europa und den USA zu der Frage: „Wie lang ist für gewöhnlich der Nutzungsausfall einer HPLC Anlage zwischen der Außer- und der Inbetriebnahme bei einer Qualifizierung“ [130]

4.4. Die kontinuierliche PQ – Ein innovatives Konzept

Aus den vorangegangenen Abschnitten ist klar geworden, dass die Qualifizierung von analytischen Instrumenten ein sehr wichtiger Prozess ist, der jedoch sehr aufwendig, kostspielig und mit Schwächen behaftet ist. Es wundert daher sehr, dass die wenigen bis heute zu diesem Thema erschienenen Arbeiten [67, 70, 72-75], die Problematik zwar erkennen, aber keine Alternative präsentieren.

Es soll deswegen ein neues Konzept für die Qualifizierung vorgestellt werden, welches Zeit und Geld spart und zudem die Lücken in der Datensicherheit schließt. Dazu wird als erstes eine Liste mit notwendigen und aus diesem Grunde verbindlichen Prüfparametern zusammengestellt. Es wird demonstriert, dass diese Parameter nicht nur mit „speziellen“ PQ Methoden und Prüfsubstanzen, sondern auch mit Methoden aus der „Laborroutine“ geprüft werden können. Die nötigen Daten

können am sinnvollsten mithilfe der zu den jeweiligen Methoden gehörigen, aber leicht erweiterten Systemtauglichkeitstests kontinuierlich erhoben werden. Um dies tun zu können wird nachgewiesen, dass ein SST Daten von mindestens gleichguter Qualität liefern kann, wie eine PQ Methode.

4.4.1. Parameterlisten für die HPLC Qualifizierung

Da gegenwärtig keine verbindliche Zusammenstellung von Prüfparametern existiert, ist eine oft gestellte Frage der häufig zu recht verunsicherten Anwender: „Was muss überhaupt geprüft werden, damit ein Gerät als qualifiziert gilt?“.

Bereits im Jahr 1996 publizierte die „UK Instrumentation Workgroup“ unter der Leitung von Dr. Mike Sargent eine generelle Prüfrichtlinie als Hilfe für die AIQ [76]. Drei Jahre später wurde diese Richtlinie durch Bedson und Rudd mit einem speziellen HPLC Teil ergänzt [67].

In einem ersten Arbeitsschritt wurden die in Bedsons und Rudds Arbeit präsentierten Parameter mit Qualifizierungs - SOPs der an dem Projekt beteiligten Kooperationspartner und SOPs verschiedener Hersteller von HPLC Instrumenten verglichen. Die Prüfparameter welche in allen SOPs zu finden waren wurden als essentiell angesehen. Die Relevanz eines Parameters sank mit der Anzahl der SOPs in denen er nicht vorkam. Auf diese Weise kristallisierten sich je eine Parameterliste für die modulare OQ [Tab. 4-1.] und die holistische PQ [Tab. 4-2.] mit insgesamt 16 Prüfparametern heraus.

Tab. 4-1.: Eine Vorauswahl von modular durchzuführenden OQ Parametern, welche nach einer ersten Sichtung und einem Vergleich von Hersteller und Anwender SOPs als notwendig angesehen wurden.

Modul	Parameter	Durchführung	Toleranz	Gefunden
Injektor	Richtigkeit des Injektionsvolumens	Bestimmung durch Vergleich der Peakflächen die durch manuelle Injektion und mit dem Probengeber erhalten wurden	Nicht definiert	$\pm 1.3\%$ ^{a)b)c)} Abweichung
Probengeber	Richtigkeit der Thermostatierung	Temperaturmessung mit einem Thermometer über eine definierte Zeitspanne. <i>(Nur für thermostatisierbare Probengeber sinnvoll)</i>	$\pm 2^\circ\text{C}$	Nicht bestimmt
	Präzision der Thermostatierung	Mehrmalige Temperaturmessung mit einem Thermometer über eine definierte Zeitspanne. <i>(Nur für</i>	$\pm 2^\circ\text{C}$	Nicht bestimmt

		<i>thermostatisierbare Probengeber sinnvoll)</i>		
Pumpsystem	Richtigkeit der Flußrate	Messung des Volumenflusses von Wasser durch eine Restriktionskapillare über eine definierte Zeitspanne	1.0 ml/min für 10.0 min $\pm 3\%$	10.0 ml
	Gradientenmischer	Bestimmung durch stufenweise Anhebung der Acetonkonzentration in Wasser und Messung der Absorption.	$\pm 1\%$ für Niederdruckgradienten	$< 1\%$ für jeden Anstieg des Additivs
Detektor	Richtigkeit der Wellenlänge	Messung des Spektrums von Holmiumperchlorat (Holmiumoxid)	361 nm ± 2 nm (andere spezifische WL möglich)	361.1 nm
	Rauschen (Peak-zu-Peak)	Bestimmung durch eine statische Messung (Pumpe bleibt aus) mit Wasser von HPLC Qualität für 15 min.	$< 5 \cdot 10^{-5}$ AU	$3.4 \cdot 10^{-5}$ AU
	Drift	Bestimmung durch eine statische Messung (Pumpe bleibt aus) mit Wasser von HPLC Qualität für eine Stunde.	$< 5 \cdot 10^{-3}$ AU/h	$2.4 \cdot 10^{-3}$ AU/h

Tab. 4-2.: Eine Vorauswahl von holistisch durchzuführenden PQ Parametern, welche nach einer ersten Sichtung und einem Vergleich von Hersteller und Anwender SOPs als notwendig angesehen wurden. a) Qualifizierung vor Transport des Gerätes b) Requalifizierung nach Wiederaufbau des Gerätes. c) ist das Ergebnis der Routine Methode. Bei a), b) und c) handelt es sich jeweils um das Ergebnis des am stärksten streuenden Peaks.

Parameter	Durchführung	Toleranz	Gefunden
Präzision des Injektionsvolumens	Bestimmung anhand der Streuung der Peakflächen einer Testsubstanz. <i>Kann auch auf dem OQ Level überprüft werden.</i>	$< 1.0\%$ RSD	0.61% ^{a)} 0.60% ^{b)} 0.96% ^{c)}
Linearität des Injektionsvolumens	Bestimmung durch sukzessive Steigerung des Injektionsvolumens (1, 10, 20, 50 µl) und anschließende Messung der Peakflächenzunahme	$R^2 \geq 0.999$	0.9999 ^{a)b)} 0,9998 ^{c)}
Verschleppung (Injection Carryover)	Bestimmung durch Injektion einer Blindprobe direkt nach einer Analyse und Bestimmung einer eventuellen Absorption <i>Kann auch auf dem OQ Level überprüft werden.</i>	Methoden spezifisch	Keine Verschleppung

Präzision der Flussrate	Bestimmung der Streuung der Retentionszeiten.	<1.0% RSD	0.40% ^{a)} 0.41% ^{b)}
Präzision der Thermostatierung des Säulenofens	Bestimmung der Streuung der Retentionszeiten.	<1.0% RSD	0.40% ^{a)} 0.41% ^{b)c)}
Linearität der Detektorantwort	Bestimmung mit mehreren Standards von unterschiedlicher Konzentration	$R^2 \geq 0.999$	0.9998 ^{a)} 0.9999 ^{b)} 0.9998 ^{c)}
Signal zu Rausch Verhältnis	Vermessen einer stark verdünnten Testsubstanz	Methoden spezifisch	Nicht bestimmt

Um diese Auswahl zu überprüfen wurde ein HPLC-Gerät anhand beider Listen überprüft. Alle Bauteile funktionierten sowohl auf modularer als auch auf holistischer Ebene innerhalb der geforderten Toleranz, sodass dieses Gerät als qualifiziert bezeichnet werden konnte. Für die PQ Untersuchungen wurde eine von Merck[®], dem Hersteller der Säule, vorgeschlagene Methode (PQ-Methode) mit Thioharnstoff, Progesteron und Anthracen (PQ-Testgemisch) verwendet. Im Anschluss wurde das Gerät abgebaut und in Einzelteilen in ein anderes, nach IQ getestetes, Labor transportiert und dort wieder zusammengesetzt. Es wurde erneut überprüft und für qualifiziert befunden. Die Unterschiede sind in Tabelle 4-2. mit a) vor dem Abbau und b) nach dem Wiederaufbau beschriftet. Eine weitere Qualifizierung wurde mit der in Abschnitt 3.3.2.1. vorgestellten Methode (Routinemethode) mit Glibenclamid, Glimepirid und zwei Abbauprodukten (RM-Testgemisch) durchgeführt und sehr gut bestanden, obwohl es sich bei dieser Methode um eine Trennung auf einem Monolithen mit Flussprogramm handelte. Für die Gegenprobe wurden einzelne Bauteile manipuliert. Zum einen wurde absichtlich eine Leckage durch eine gebrochene Pumpenkopfdichtung verursacht. Zum anderen wurde eine leistungsschwächere (ausgemusterte) UV-Lampe eingesetzt. Bei einer erneuten Testung zeigten sich wie erwartet Leistungseinbußen in Form von nach hinten verschobenen Retentionszeiten der Testsubstanzen und einer Zunahme ihrer Streuung. Zudem stieg das Detektorrauschen an während gleichzeitig die Peakflächen kleiner wurden, was zu einer Abnahme des S/N-Verhältnisses und damit verbunden einer Abnahme der Präzision führte.

Beide Manipulationen simulierten den Verschleiß der in der Laborroutine stattfindet und zeigten, dass sie bei einer Untersuchung anhand der Parameterlisten sowohl mit einer echten PQ-Methode als auch mit einer möglichen Methode aus der Laborroutine gefunden werden können.

Die in den Tabellen 4-1. und 4-2. gelisteten Parameter wurden am 30. Mai 2008 einer Expertengruppe während des Treffens der Herstellungs- und Kontrollleiter Norddeutschlands (HK-Nord) in Salzgitter-Ringelheim vorgestellt. Ferner wurden sie auch am 26. Juni 2008 der Abteilung für Qualitätskontrolle von Sanofi-Aventis in Frankfurt und am 27. Juni 2008 der Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik (APV) in Mainz präsentiert.

4.4.2. Optimierung der Parameterlisten für die HPLC-Qualifizierung

Obwohl die Zusammenstellung der Parameter durchweg positive Resonanz bekam, wurde unsere Idee, zu versuchen die Listen weiter zu optimieren und zu vereinfachen von den Experten sehr begrüßt. So wurden die Listen der Qualifizierungsparameter erneut überprüft, insbesondere im Hinblick auf die Möglichkeit einer Zusammenlegung von OQ und PQ zu einem holistischen Qualifizierungskomplex. Ferner sollte eine möglicherweise vorhandene Redundanz von Prüfungen ausgeschlossen werden. Der Einsatz einer Routine-Methode sollte die Durchführung der Testungen effizienter und zeitsparender machen.

4.4.2.1. Weggelassene oder zusammengeführte Parameter

Die Bestimmung der *Richtigkeit des Injektionsvolumens* ist aufwendig und zudem fehlerbehaftet. Sowohl ein manueller Injektor als auch ein automatischer Probengeber werden überprüft, indem die nach der Injektion erhaltenen Peakflächen mit Peakflächen verglichen werden, die mit einer Referenzdosierschleife erhalten wurden. Diese Prüfung muss für alle genutzten Injektionsvolumina durchgeführt werden, was ein zeitaufwendiges Wechseln der Dosierschleifen mit sich bringt. Außerdem sind die Referenzdosierschleifen selbst kalibriert, was ein Unsicherheitsfaktor ist, zumal sich durch die mechanische Belastung bei häufigem Wechsel das absolute Volumen leicht verändern kann. Da in der Praxis ohnehin immer mit internen sowie externen Standards oder mit Kalibriergeraden gearbeitet wird, ist ein absolut richtiges Injektionsvolumen nicht entscheidend, solange es reproduzierbar ist. Deswegen wurde dieser Parameter wieder aus der Liste entfernt.

Das *Signal zu Rausch-Verhältnis* (s. Abschnitt 2.3.4.) ist eine wichtige Größe zur Beurteilung eines Chromatogramms. Es ist jedoch methodenspezifisch, weswegen es bei der Methodenvalidierung bestimmt werden muss [42, 45]. Bei der Qualifizierung hingegen ist die Bestimmung weniger sinnvoll, weshalb sie auch aus der Liste gestrichen wurde. Nichtsdestoweniger beeinflusst ein schlechtes S/N die Präzision der Peakflächenintegration [26], deshalb kann es im Falle einer zu großen Streuung der Flächen zusätzlich zum Detektorrauschen bestimmt werden und bei der Findung des Problems helfen.

Die *Linearität der Detektorantwort und des Injektionsvolumens* wurden zusammengelegt, da sie zwar unterschiedlich bestimmt werden aber beide das gleiche Ergebnis, nämlich -eine korrekte Funktion des Injektors und des Detektors vorausgesetzt- eine Gerade ergeben.

Die Linearität des Detektors wird durch mehrmalige Injektion eines Standards - geläufig ist Coffein- von unterschiedlicher Konzentration bestimmt. Die erhaltenen Signale bzw. Peakflächen werden dann gegen die Konzentration aufgetragen [Abb. 4-3.]. Um die Linearität des Injektionsvolumens zu untersuchen wird erneut Coffein als Standard mehrmals hintereinander vermessen. Bei jeder folgenden Injektion wird das Injektionsvolumen vergrößert. Die erhaltenen Peakflächen werden gegen die Injektionsvolumina aufgetragen [Abb. 4-4.].

Es fällt auf, dass in beiden Fällen eine Gerade das Ergebnis des Plottens ist. Das ist nicht überraschend, da sowohl durch das steigende Injektionsvolumen, als auch durch die höheren Konzentrationen die absolute Analytkonzentration erhöht wird. Im Fall der Messung der Injektorlinearität wird stillschweigend von einem linear funktionierenden Detektor ausgegangen.

Umgekehrt kann man bei Vorliegen eines linearen Injektionsvolumens auf eine lineare Detektorantwort schließen, weswegen die zweite Prüfung unterbleiben kann. Zudem wird das Ergebnis bei der Prüfung des Injektionsvolumens nicht durch mögliche Verdünnungsfehler verfälscht (vgl. $R^2=0,9999$ [Abb. 4-4.] und $R^2=0,9998$ [Abb. 4-3.]. Allerdings müssen in diesem Fall bei einem OOS (Außerhalb der Spezifikation = engl. Out of Specification) Ergebnis beide Module gründlich überprüft werden, weil der Fehler noch nicht enger eingegrenzt wurde.

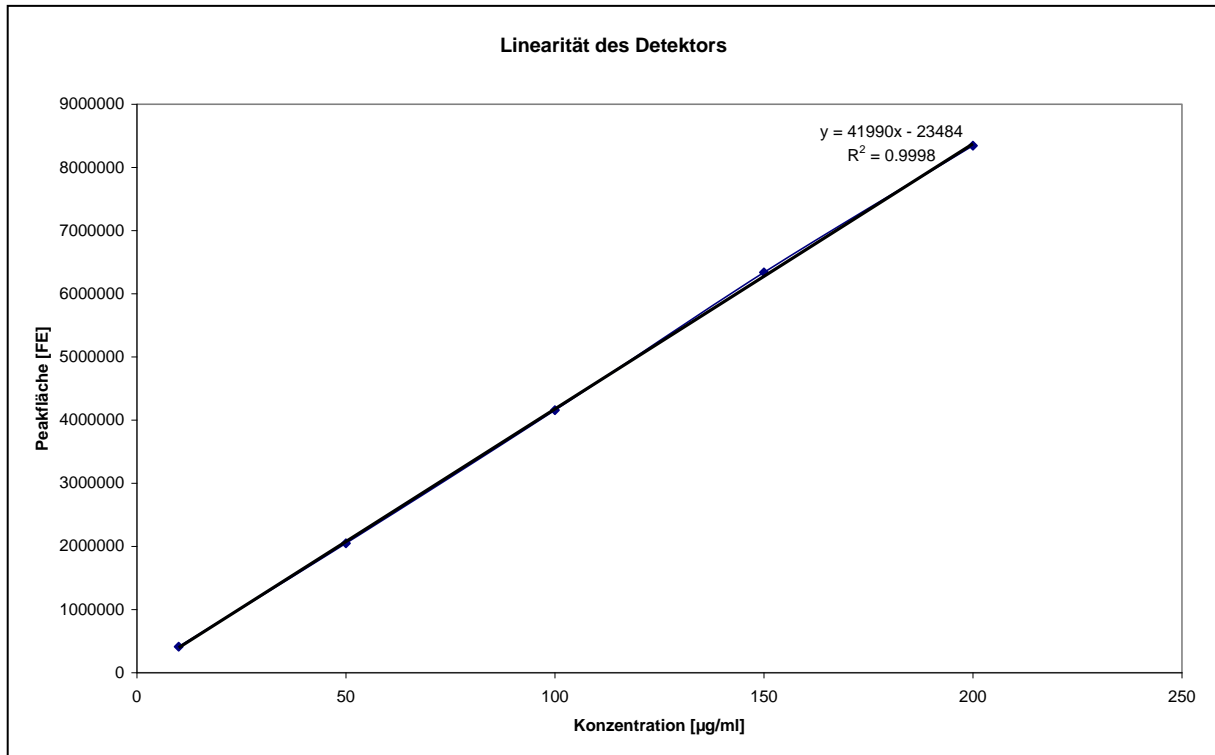


Abb. 4-3.: Es wurden fünfmal jeweils 10µl des Standards Coffein mit den Konzentrationen 10, 50, 100, 150 und 200µg/ml injiziert. Gemessen wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda=272$ nm. Das Bestimmtheitsmaß (R^2) liegt mit 0,9998 über dem geforderten Wert von 0,999, somit ist Linearität gegeben.

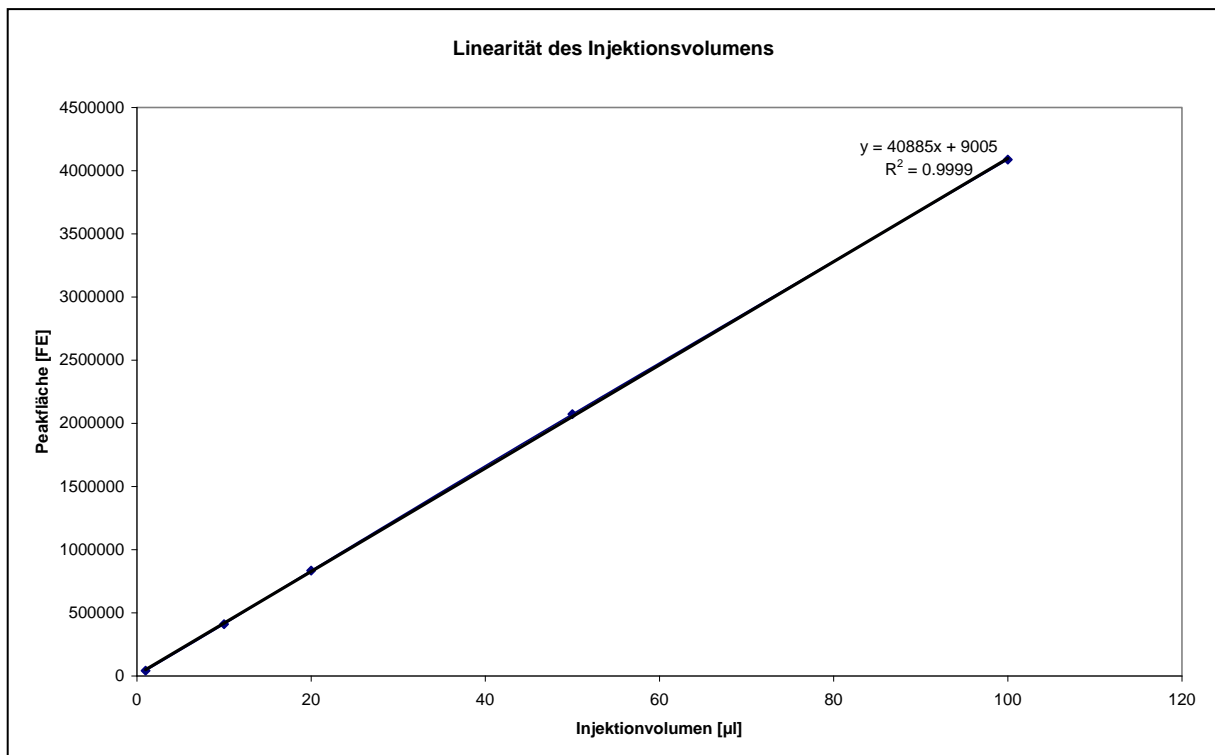


Abb. 4-4.: Es wurde fünfmal der Standard Coffein mit der Konzentration 10µg/ml injiziert. Die Injektionsvolumina betrugen 1, 10, 20, 50 und 100µl. Das Bestimmtheitsmaß (R^2) liegt mit 0,9999 über dem geforderten Wert von 0,999, somit ist Linearität gegeben.

Es sei an dieser Stelle erwähnt, dass ein hohes Bestimmtheitsmaß (R^2) nicht immer Linearität garantiert. Jedoch ist hier nicht das Ziel, eine lineare Funktion nachzuweisen, sondern lediglich zu überprüfen, ob man sich im linearen Bereich des Detektors befindet. Für diesen Zweck ist das leicht zu bestimmende R^2 ein gut geeigneter Zahlenwert, da es bei einer Abweichung von der Linearität schnell kleiner wird. Um dennoch sicherzugehen, dass es sich bei einer Abweichung tatsächlich nur um eine Abweichung von der Linearität und nicht um einen Trend der Kalibriergerade handelt, kann zusätzlich noch ein Residuenplot [78] angefertigt werden [Abb. 4-5.].

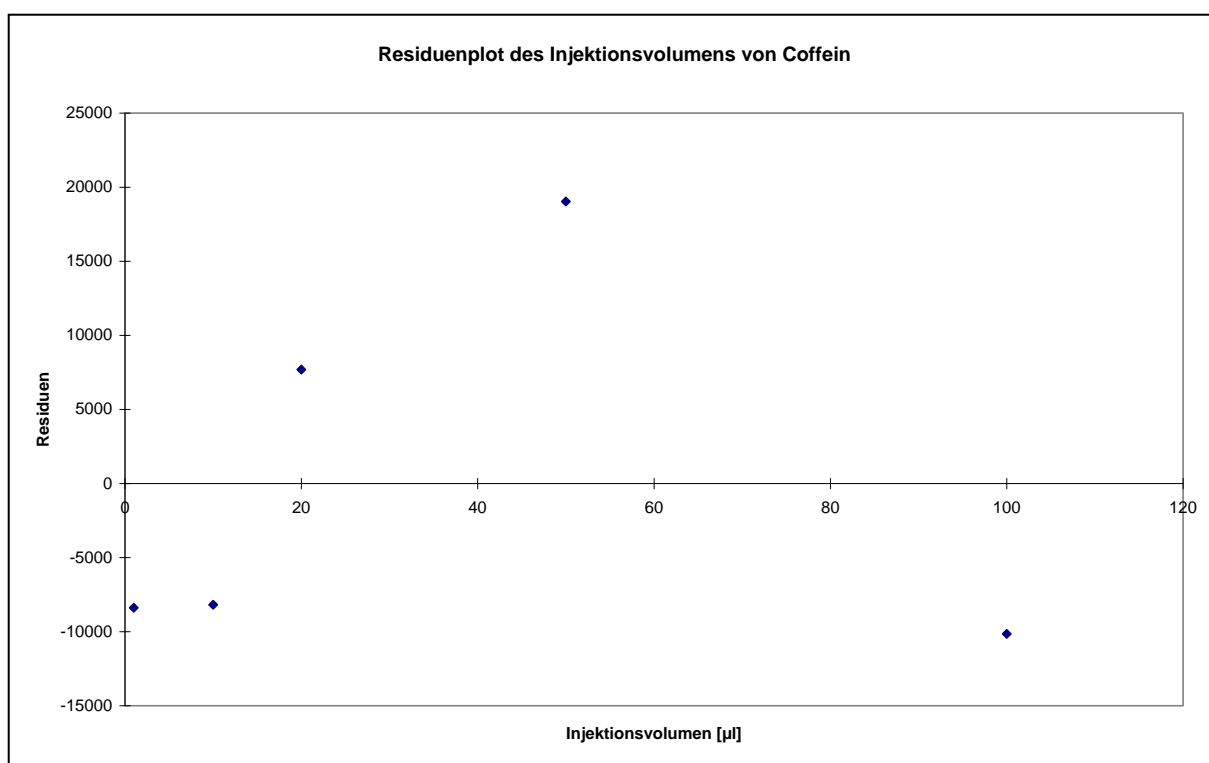


Abb. 4-5.: Die Residuen geben die Differenz zwischen der Regressionsgerade und den Messwerten an. Sie haben hier eine zufällige Streuung um den Nullpunkt, somit liegt somit kein Trend vor.

Für diese Bestimmungen wurde in Wasser gelöstes Coffein bei 272 nm vermessen. Die chromatographische Säule wurde durch eine Restriktionskapillare ersetzt. Die Prüfung auf Linearität ist Bestandteil einer jeden Methodenvvalidierung, wo sie in einem definierten Arbeitsbereich vorliegen soll. Die Frage ist also, warum Coffein in Wasser verwenden, wenn die Linearität auch mit der gerade im Labor laufenden Methode bestimmt werden kann. Beispielhaft haben wir dies anhand unserer eigenen Routine-Methode demonstriert [Abb. 4-6.]. Obwohl das erhaltene $R^2=0,9998$ durch Störeinflüsse der Methode („echte“ mobile Phase statt Wasser, eine monolithische Säule statt Restriktionskapillare, eine chromatographische Trennung

von vier Substanzen etc.) etwas schlechter ausfällt, erfüllt es dennoch die Anforderungen. Der Residuenplot [Abb. 4-7.] lässt außer dem Streumuster des Injektors keinen Trend erkennen.

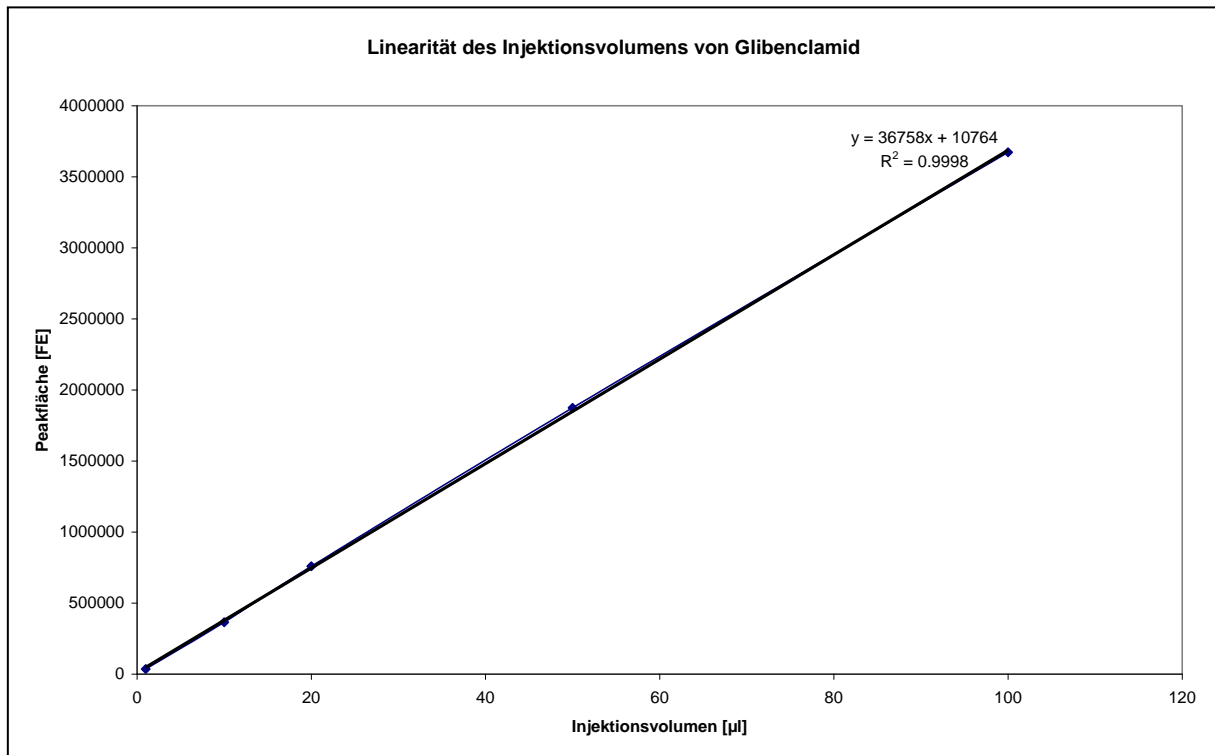


Abb. 4-6.: Die Linearität des Injektionsvolumens und somit auch der Detektorantwort kann auch mit einer gerade im Labor laufenden Methode (hier unsere Routine-Methode) bestimmt werden.

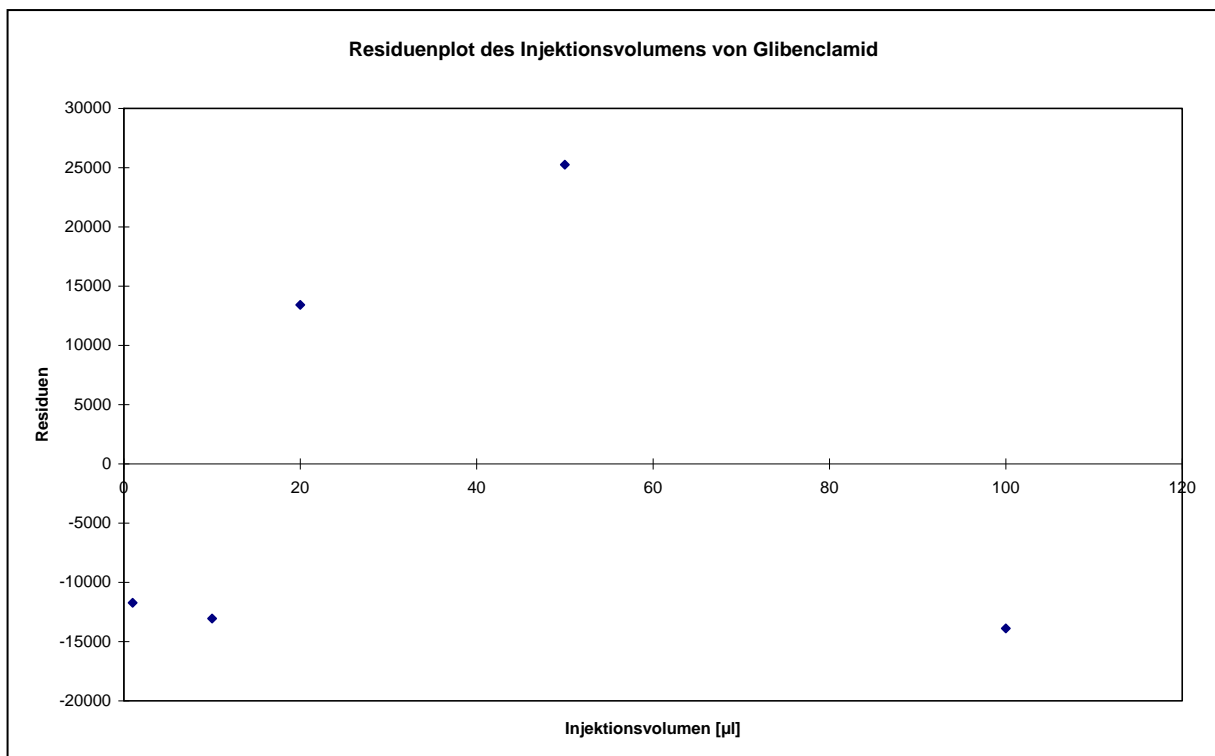


Abb. 4-7.: Der Residuenplot der Routine-Methode zeigt keinen Trend, allerdings fällt ein sehr ähnliches Streumuster des Injektors auf (vgl. Abb. 4-5.)

4.4.2.2. Holistische OQ/PQ - Direkt bestimmbare Parameter

Holistische Prüfungen bieten die Möglichkeit alle Bauteile simultan und unter realitätsnäheren Bedingungen zu testen. Deswegen sollten laut der amerikanischen FDA (Food and Drug Administration) die Parametertests, wann immer möglich auf dieser Ebene durchgeführt werden [79]. Auch für unser Konzept einer einfacheren OQ/PQ ist die holistische Ebene sehr dienlich. Sie erlaubt eine leichtere Handhabung mit Zeitersparnis, da viele der notwendigen Parameter direkt aus Systemeignungstests bestimmt werden können.

Injektor

Linearität der Detektorantwort / des Injektionsvolumens:

Die Prüfung wird, wie unter 4.4.2.1. beschrieben durchgeführt. Diese Parameter lassen sich im holistischen Ansatz während eines SSTs sehr gut überprüfen. Es müssen dafür im SST extra Läufe eingeplant werden, was zwar einen geringen Mehraufwand bedeutet, sich jedoch schnell rechnet, wenn man die PQ und den damit verbundenen Geräteausfall berücksichtigt.

Verschleppung (Injektions-Carryover)

Diese Prüfung kann ohne Probleme während eines SSTs stattfinden, indem zwischen zwei Läufen eine Leerinjektion durchgeführt. Es dürfen keine Substanzreste mehr eluieren.

Probengeber

Präzision der Thermostatisierung:

Die Prüfung dieses Parameters ist nur bei temperierten Probengebern sinnvoll und kann wie bisher durch mehrmaliges Messen mit einem geeigneten Thermometer durchgeführt werden. Sie ist weder technisch anspruchsvoll noch schwierig durchzuführen, also kann sie bei Bedarf neben der Routineanalyse, also auf der holistischen Ebene stattfinden.

Pumpensystem

Richtigkeit der Flussrate:

In der klassischen OQ bzw. PQ wird auf der modularen Ebene der Volumenfluss mit Wasser von HPLC-Qualität gemessen. Für ein aussagekräftiges Ergebnis muss die

Leistung der Pumpe unter Druck überprüft werden. Dazu wird in der Regel eine Restriktionskapillare oder eine Testsäule eingespannt, um den nötigen Rückdruck zu generieren [33]. Das System wird luftblasenfrei gespült und die Flussrate wird auf 1,0 ml/min eingestellt. Anschließend wird das Volumen des über einen definierten Zeitraum, z.B. 10 min, fließenden Wassers aufgefangen und entweder direkt in einem geeichten Messkolben bestimmt, oder über die Masse, Temperatur und Dichte berechnet.

Die Nachteile dieses Verfahrens sind neben der modularen Durchführung, das umständliche Wechseln der Säulen, der Austausch der mobilen Phase gegen Wasser und zurück sowie die daraus resultierenden zeitaufwendigen Equilibrierungen.

Für den holistischen Ansatz wurde geprüft, ob eine Aussage über die Flussratenrichtigkeit auch mit der normalen analytischen Säule anstelle der Restriktionskapillare und mit der normalen mobilen Phase anstatt von Wasser gemacht werden kann. Als Vergleichswert wurden die Ergebnisse aus Tabelle 3-6. herangezogen. In einer ersten Versuchsreihe wurde eine klassische, gepackte RP-Säule (LiChroCART® 125-4 LiChrospher® 100 RP-18, 5 µm) zur Simulation einer möglichen analytischen Säule eingesetzt und die Standardflussrate 1,0 ml/min getestet. In Abschnitt 3.3. wurde auf die Notwendigkeit einer erweiterten Qualifizierung des Pumpensystems bei Verwendung von Monolithen hingewiesen. Deswegen wurde auch eine Versuchsreihe mit einer monolithischen Säule durchgeführt, allerdings nur bis 5,0 ml/min, da aus früheren Experimenten die Leistungsschwäche der Pumpe bei höheren Flussraten bekannt war (Erklärung: siehe Abschnitt 3.3.). Außer verschiedener Flussraten wurde vor allem der Einfluss von unterschiedlichen, in der RP-HPLC gängigen Zusammensetzungen des Fließmittels untersucht. Eine Übersicht der Ergebnisse ist in Tabelle 4.3. gegeben.

Tab. 4-3: Die verschiedenen Zusammensetzungen des Fließmittels haben keinen signifikanten Einfluss auf die Richtigkeit der Flussrate. Eine holistische Bestimmung während eines SST ist also mit einem geringen Mehraufwand durchaus möglich, was den Arbeitsaufwand bei der Prüfung insgesamt deutlich reduziert, da weder Säule noch mobile Phase gewechselt werden müssen.

Gepackte Säule					Monolithische Säule			
Zusammensetzung der mobilen Phase [m/m]	Flussrate [ml/min]	Fließzeit [min]	Soll Volumen [ml]	Ist Volumen [ml]	Flussrate [ml/min]	Fließzeit [min]	Soll Volumen [ml]	Ist Volumen [ml]
ACN 100%	1,000	10,0	10,0	9,98	1,000	10,0	10,0	10,0
	--	--	--	--	2,000	5,0	10,0	9,98
	--	--	--	--	2,500	4,0	10,0	9,98

4. Qualifizierung Analytischer Instrumente

	--	--	--	--	5,000	2,0	10,0	9,93
ACN 50% : Wasser 50%	1,000	10,0	10,0	9,99	1,000	10,0	10,0	9,99
	--	--	--	--	2,000	5,0	10,0	9,99
	--	--	--	--	2,500	4,0	10,0	9,97
	--	--	--	--	5,000	2,0	10,0	9,91
ACN 20% : Wasser 80%	1,000	10,0	10,0	9,98	1,000	10,0	10,0	9,98
	--	--	--	--	2,000	5,0	10,0	9,97
	--	--	--	--	2,500	4,0	10,0	9,97
	--	--	--	--	5,000	2,0	10,0	9,92
ACN 50% : PO ₄ ³⁻ Puffer 50%	1,000	10,0	10,0	9,99	1,000	10,0	10,0	10,0
	--	--	--	--	2,000	5,0	10,0	9,99
	--	--	--	--	2,500	4,0	10,0	9,98
	--	--	--	--	5,000	2,0	10,0	9,91
ACN 20% : PO ₄ ³⁻ Puffer 80%	1,000	10,0	10,0	9,98	1,000	10,0	10,0	9,99
	--	--	--	--	2,000	5,0	10,0	9,97
	--	--	--	--	2,500	4,0	10,0	9,97
	--	--	--	--	5,000	2,0	10,0	9,91
MeOH 100%	1,000	10,0	10,0	9,97	1,000	10,0	10,0	10,0
	--	--	--	--	2,000	5,0	10,0	9,98
	--	--	--	--	2,500	4,0	10,0	9,97
	--	--	--	--	5,000	2,0	10,0	9,92
MeOH 50% : Wasser 50%	1,000	10,0	10,0	9,98	1,000	10,0	10,0	9,99
	--	--	--	--	2,000	5,0	10,0	9,98
	--	--	--	--	2,500	4,0	10,0	9,98
	--	--	--	--	5,000	2,0	10,0	9,90
MeOH 20% : Wasser 80%	1,000	10,0	10,0	9,99	1,000	10,0	10,0	9,99
	--	--	--	--	2,000	5,0	10,0	9,98
	--	--	--	--	2,500	4,0	10,0	9,96
	--	--	--	--	5,000	2,0	10,0	9,92

Die Ergebnisse zeigen, dass die verschiedenen Zusammensetzungen der mobilen Phase keinen signifikanten Einfluss auf die Richtigkeit der Flussrate haben. Die Abweichungen vom Sollwert stimmen recht gut mit den bereits in Abschnitt 3.3. beschriebenen überein. Hinzu kommt außerdem die größere Messgenauigkeit bei höheren Flussraten, da sich die Messzeiträume verkürzten. Dennoch liegen alle Werte innerhalb der geforderten Toleranz von $\pm 3\%$. Es kann also abschließend festgehalten werden, dass die Bestimmung der Flussratenrichtigkeit durchaus während eines alltäglichen SSTs mit einem geringen Mehraufwand bestimmt werden kann, ohne die Säule oder die mobile Phase austauschen zu müssen.

Richtigkeit des Gradientenmischers:

In der klassischen OQ wird dieser Test modular durchgeführt und erfordert ebenso wie die Prüfung der Flussrate ein Auswechseln der Säule gegen die Restriktionskapillare und ein spezielles Fließmittel. Dieses besteht aus reinem Wasser im ersten Fließmittelreservoir und einer Acetonlösung (0,1% m/m) in einem zweiten. Nach dem Start des Tests wird der Anteil an Acetonlösung entweder linear oder inkrementell erhöht und die UV Absorption bei 254 nm gemessen [33, 80]. Aus dem Verlauf der Geraden oder aus den Absorptionsstufen lässt sich das Mischungsverhältnis und somit die richtige Funktion des Mischers bestimmen [Abb. 4-8.].

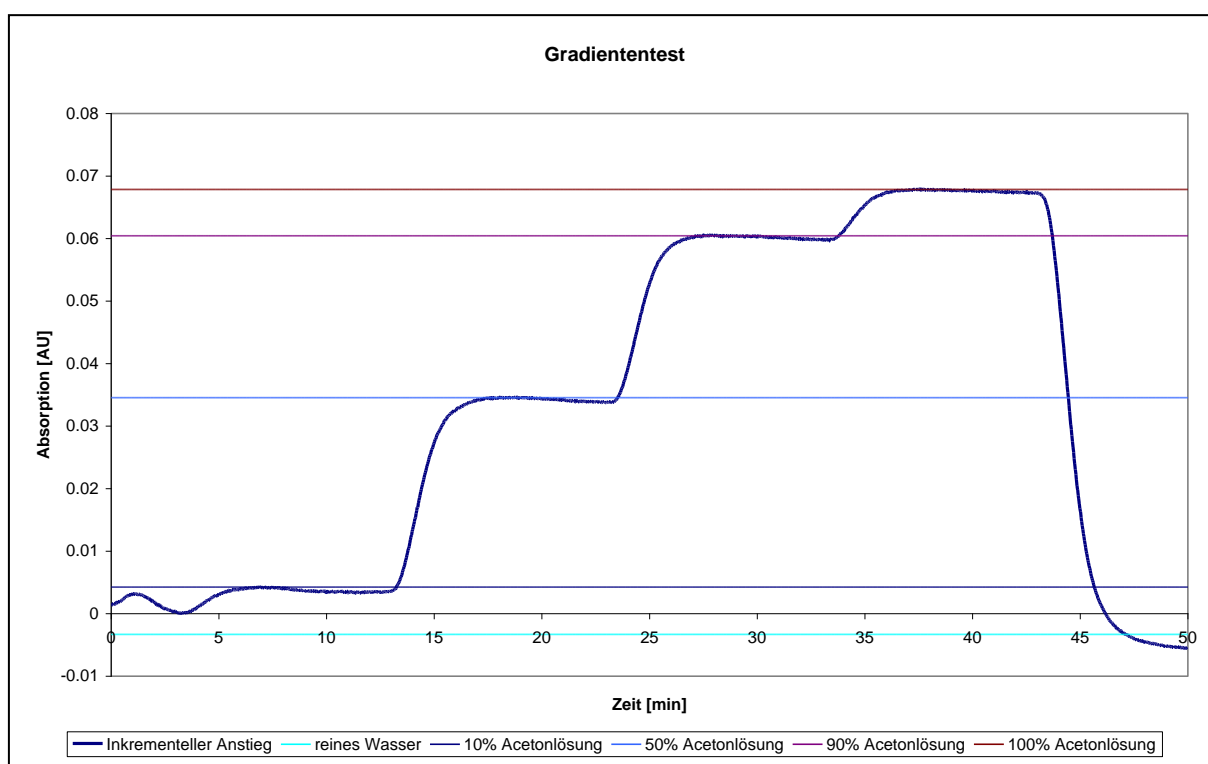


Abb. 4-8: Der Fließmittelgradient war wie folgt eingestellt: 0 – 10 min 10% Acetonlösung; 10 – 20 min 50% Acetonlösung; 20 – 30 min 90% Acetonlösung und 30 – 40 min 100% Acetonlösung. Aus dem Anstieg der Absorption lassen sich Rückschlüsse auf die richtige Funktion des Gradientenmischers ziehen.

Dieser Test ist leider nicht in das holistische Konzept überführbar, da für seine Durchführung spezielle Chemikalien und Lösungen benötigt werden. Allerdings ist es möglich anhand der Retentionszeiten von den Analyten zu erkennen, ob der Gradientenmischer korrekt funktioniert. Wird in einer Methode ein Fließmittelgradient verwendet, so erhält man bei korrekter Funktion des Mischers jedes Mal wenn der SST durchgeführt wird Retentionszeiten, die stabil sind und wenig streuen. Gerade durch die häufige Durchführung eines SST bemerkt man sehr schnell, wenn

Diskrepanzen, wie eine Verschiebung der Retentionszeiten, auftreten. Dies kann immer viele Ursachen haben, die in einem solchen Fall alle untersucht werden müssen. Ein klassischer Gradiententest [Abb. 4-8.] ist an dieser Stelle erforderlich. Wenn allerdings keine Abweichungen auftreten, was die Regel sein sollte, kann von einer einwandfreien Funktion, auch des Gradientenmischers ausgegangen werden. Auf die Durchführung dieses Funktionstests kann also bei reproduzierbaren Retentionszeiten verzichtet werden.

Detektor

Richtigkeit der Wellenlänge:

Für eine sichere qualitative und quantitative Bestimmung mittels eines UV/VIS Detektors muss gewährleistet sein, dass die eingestellte Wellenlänge auch tatsächlich eingestrahlt wird. Überprüft wird dies mithilfe von Referenzsubstanzen, deren UV-Spektren bekannt sind und Absorptionsmaxima verteilt über den UV und VIS Bereich besitzen. Die bei weitem am häufigsten eingesetzte Referenz ist ein Holmiumoxid Flüssigfilter (auch Holmiumperchlorat Filter genannt) bestehend aus Holmiumoxid gelöst in Perchlorsäure ($\text{Ho}(\text{ClO}_4)_3$) abgefüllt in einer verschlossenen Küvette aus Quarzglas [81]. In einigen UV/VIS und Dioden Array Detektoren wird auch Holmiumoxid als Feststoff in Form eines in den Strahlengang drehbaren Filterglases verwendet [82]. Das erhaltene Spektrum weist charakteristische Absorptionsmaxima auf [Abb. 4-9.], die vom Detektor mit einer Toleranz von $\pm 2 \text{ nm}$ [67] gefunden werden müssen [Abb. 4-10.].

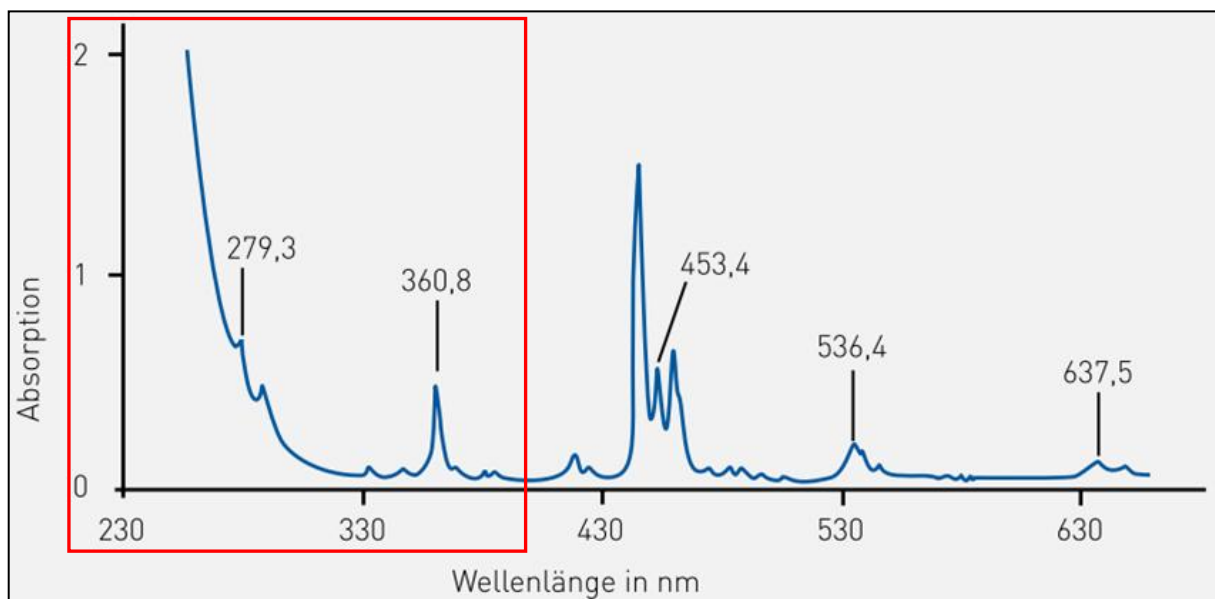


Abb. 4-9: Das Spektrum eines Holmiumoxid Filterglases [81] mit den charakteristischen Absorptionsmaxima. Der rote Rahmen markiert den Bereich (200-400 nm) in dem typischerweise in der pharmazeutischen Analytik gemessen wird.

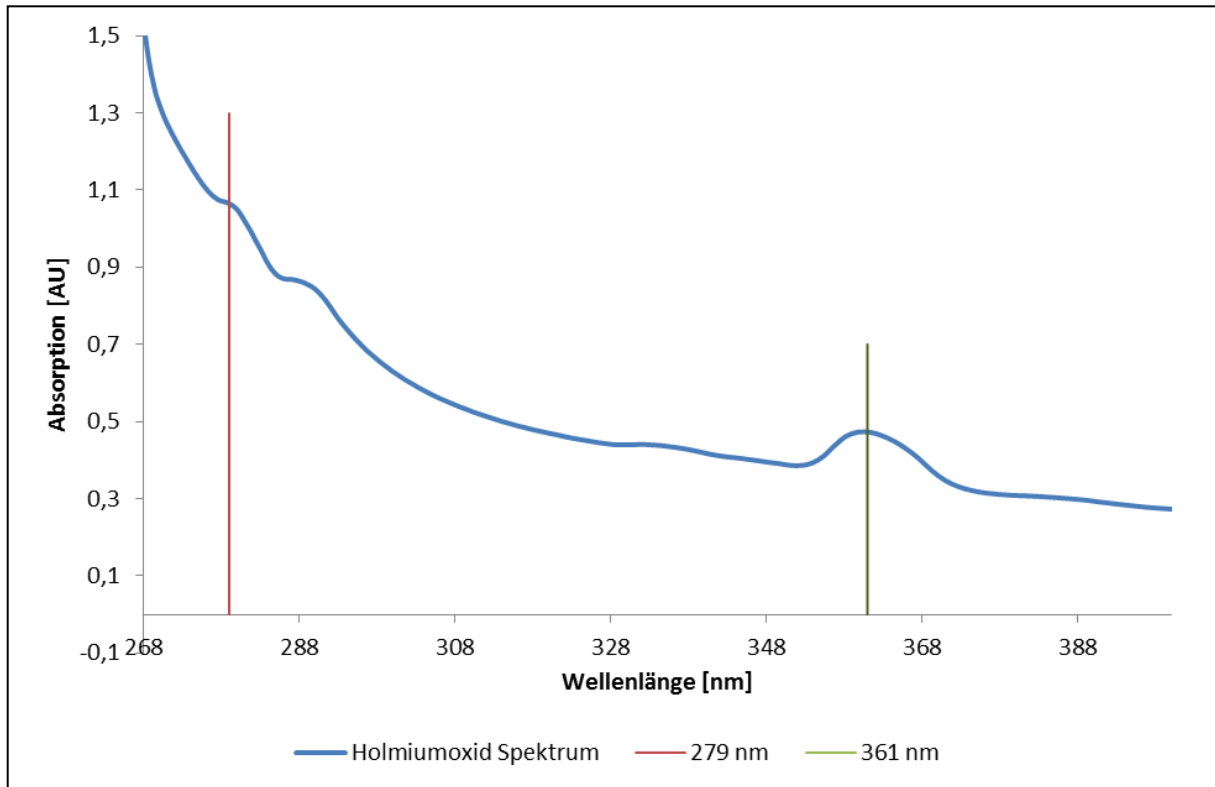


Abb. 4-10: Das Spektrum des im DA-Detektor integrierten Holmiumoxid Filterglases mit den gefundenen Absorptionsmaxima. Die geringen Abweichungen des Detektors liegen weit innerhalb der Toleranzgrenzen.

Alle UV-aktiven Substanzen verfügen über ein UV-Spektrum mit mehr oder weniger ausgeprägten Absorptionsbanden. Warum muss die Wellenlänge also mit Holmiumoxid überprüft werden? Diese Frage stellt sich erst recht, wenn man bedenkt, dass in der Praxis alternativ Coffein und Anthracen verwendet werden dürfen [73, 75]. Theoretisch sollte es daher möglich sein, die Richtigkeit der Wellenlänge mit jeder UV aktiver Substanz während eines SSTs nachweisen zu können. Dies trifft allerdings nur eingeschränkt zu, da zuerst drei Bedingungen erfüllt sein müssen. Die Substanz muss vor allem ein UV-Spektrum mit gut ausgebildeten Absorptionsbanden besitzen. Am besten geeignet sind Spektren, die mehrere Absorptionsmaxima verteilt über den untersuchten Wellenlängenbereich besitzen. Im UV Bereich (200 – 400 nm) sollten, wie bei Holmiumoxid mindestens zwei Maxima vorliegen, damit die Bestimmung als gleichwertig angesehen werden kann. Ferner sollten die Maxima nicht zu breit sein, damit eine falsche Wellenlänge schnell erkannt wird. UV-Spektren, die über den gesamten Messbereich nur einen einzigen, langgezogenen Peak, wie etwa die meisten Benzodiazepine, besitzen, sind für diesen Zweck ungeeignet. Zuletzt sollte darauf geachtet werden, dass die vermessene Substanz stabil ist und sich nicht zersetzt, wodurch sich schließlich auch

das UV-Spektrum ändern würde. Es muss auch eine mögliche batho- oder hypsochrome Verschiebung bei verschiedenen pH Werten berücksichtigt werden. Werden diese Kriterien von einem in der Routine eingesetzten Analyten erfüllt, so kann während des SSTs sein UV-Spektrum für die Bestimmung der Wellenlängenrichtigkeit in einem holistischen Ansatz herangezogen werden. Dafür sind keine Erweiterungen des SST notwendig, da sich mit modernen DA-Detektoren die UV-Spektren aufzeichnen und anschließend über die Software automatisch auswerten lassen. Beispielhaft ist dies anhand des Spektrums von Glibenclamid aus unserer Routine-Methode dargestellt [Abb. 4-11.].

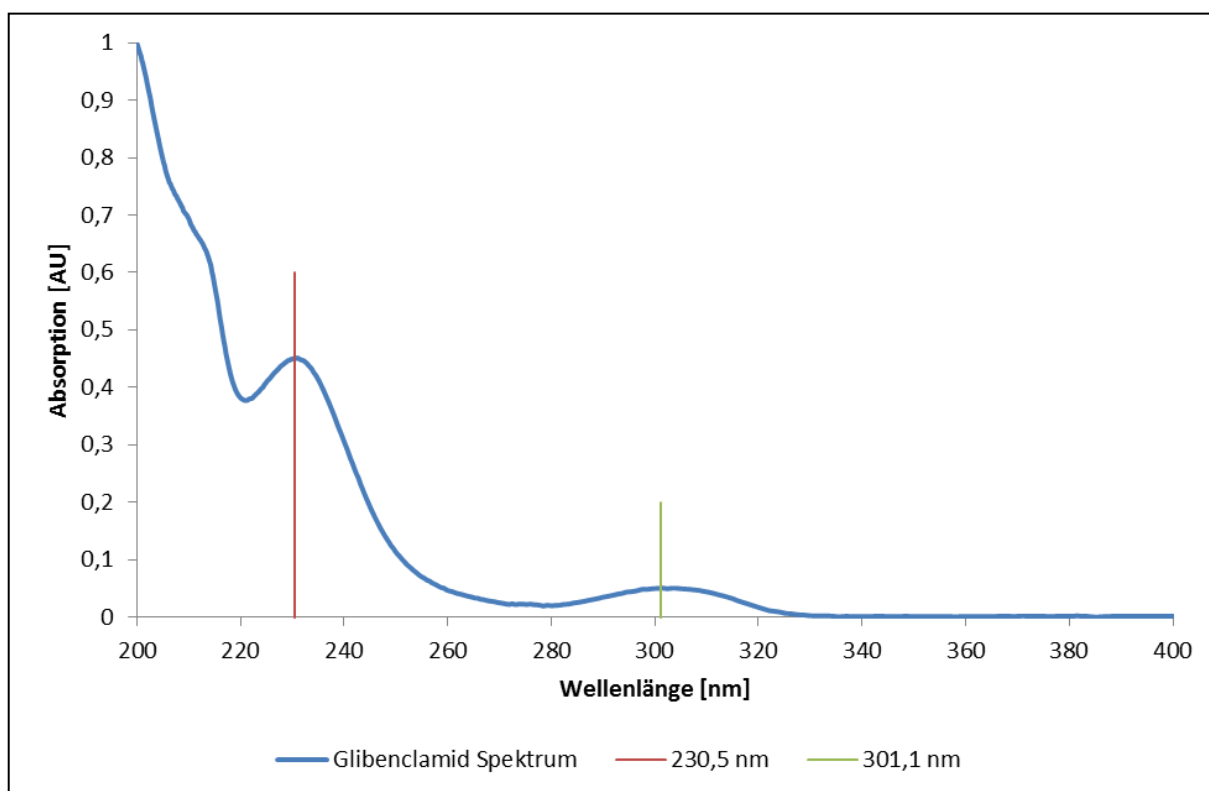


Abb. 4-11: Das Spektrum von Glibenclamid mit den beiden Absorptionsmaxima. Beide entsprechen sehr genau sowohl den Literatur Vorgaben, als auch früher mit diesem Gerät aufgezeichneten Glibenclamid Spektren.

Man erkennt im Bereich zwischen 200 und 400 nm zwei gut definierte Absorptionsmaxima $\lambda_{\max 1} = 230,5 \text{ nm}$ und $\lambda_{\max 2} = 301,1 \text{ nm}$. Sie stimmen sehr genau mit den Literaturangaben von 229 – 231 nm für $\lambda_{\max 1}$ und 301 – 302 nm für $\lambda_{\max 2}$ [83] bzw. 230,4 nm für $\lambda_{\max 1}$ und 301,3 nm für $\lambda_{\max 2}$ [84]. Des Weiteren wurden die erhaltenen Daten mit denen verglichen, die ein halbes Jahr, ein Jahr und sogar sechs Jahre zuvor mit diesem Gerät gemessen wurden. Es konnte keine Veränderung der Absorptionsmaxima festgestellt werden, was zeigt, dass auch diese Methode zur Bestimmung der Wellenlängenrichtigkeit geeignet ist.

Bei ungeeigneten Analyten muss jedoch auf die klassischen Standards wie Holmiumoxid oder Coffein zurückgegriffen werden.

Detektorrauschen und Drift (vgl. 2.2.5.3. und 2.2.5.4.):

Typischerweise werden diese beiden Parameter auf modularer Ebene in einer statischen Messung ermittelt. Statisch bedeutet, dass ohne fließende mobile Phase, also bei ausgeschalteter Pumpe gemessen wird. Die Durchflusszelle wird gereinigt und mit Wasser von HPLC-Qualität luftblasenfrei befüllt. Im Anschluss wird für eine definierte Zeitspanne, z.B. 15 min bei der Rauschprüfung, [82] die Basislinie aufgenommen. Dies kann entweder bei einzelnen, vorher bestimmten Wellenlängen geschehen (UV- und DA- Detektor), oder es wird ein bestimmter Wellenlängenbereich (z.B. 240 – 260 nm) aufgenommen und integriert (nur mit DAD möglich) [82]. Für die Auswertung wird die Basislinie in Segmente unterteilt und für jedes dieser Segmente wird die Amplitude des Rauschens, der sogenannte Peak-to-Peak-Noise, bestimmt [Abb. 4-12.]. Zum Schluss wird ein Mittelwert gebildet, welcher einen Schwellenwert nicht überschreiten darf.

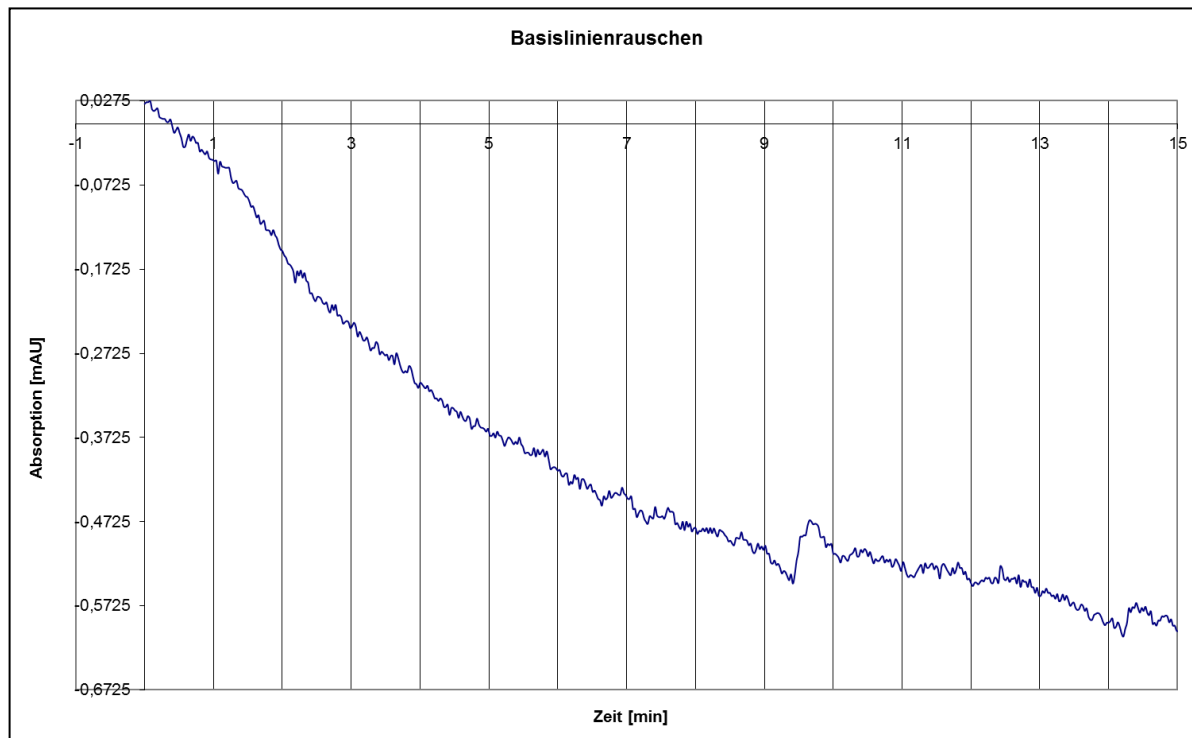


Abb. 4-12: Nach 15 min statischer Messung wird der Peak to Peak Noise für jeden der Abschnitte bestimmt und es wird ein Mittelwert errechnet. In diesem Fall beträgt das mittlere Rauschen $2,99 \cdot 10^{-5}$ AU und entspricht damit den Anforderungen für den Detektor [82].

Die Grenzen für das Rauschen und die Drift sind abhängig von der Leistungsfähigkeit des verwendeten Detektors und sollten daher nicht pauschal festgelegt werden. Für den von uns verwendeten DA-Detektor gibt der Hersteller einen Wert von $< 5 \cdot 10^{-5}$ AU für das Rauschen und $< 5 \cdot 10^{-3}$ AU/h für die Drift an. Die auf modularer Ebene gemessenen Werte für das Rauschen lagen zwischen $2,99 \cdot 10^{-5}$ AU und $3,40 \cdot 10^{-5}$ AU. Die Drift variierte zwischen $2,40 \cdot 10^{-3}$ AU/h und $3,00 \cdot 10^{-3}$ AU/h. Die vom Hersteller angegebenen Werte, die zwar unter den geforderten Idealbedingungen (gereinigte Durchflussszelle, reinstes Wasser und statische Messung) erreicht und sogar unterboten werden können, jedoch unter normalen Arbeitsbedingungen nicht zu erzielen sind, spiegeln immer ein „best-case“ Szenario wider [73]. An dieser Stelle ist die Frage berechtigt, ob für die Qualifizierung des Detektors wirklich die unter den best möglichen Voraussetzungen erhaltenen Werte maßgeblich sein sollten, oder ob der Nachweis (einer etwas schlechteren) Leistung unter realen Bedingungen nicht ausreicht. In ihrer Arbeit [73] stellten die Autoren Huber und Welebob fest, dass die vom Hersteller festgelegten Akzeptanzgrenzen in neueren Detektoren viel kleiner als die Nachweisgrenzen der meisten Applikationen sind. Ein Gerät daraufhin zu testen kann folglich sehr großen Einfluss auf die Wartungskosten haben, ohne dass dieser Test wirklich sinnvoll ist. Vielmehr, so die Autoren, sei es wichtig diese Grenzen als das maximal mögliche zu sehen, für die eigenen Anwendungen aber weniger stringente Werte zu setzen. Ein Rauschwert von $2 \cdot 10^{-4}$ AU ist ihrer Meinung nach ein gutes Limit für die meisten Applikationen. Ein strikteres Limit sei nur in besonderen Fällen, wie etwa bei Spurenanalysen gerechtfertigt und nötig.

Für den holistischen Ansatz haben wir den Wert für das Rauschen von Huber und Welebob übernommen. Um die Durchführung zu vereinfachen und zu verkürzen, wurden beide Parameter mit der normalen Durchflussszelle und mit verschiedenen mobilen Phasen (Zusammensetzungen wie bei der Bestimmung der Flussrate) untersucht. Erwartungsgemäß stieg das Rauschen mit steigender Konzentration des organischen Anteils der mobilen Phase. Überraschenderweise blieb das Rauschen bei einer statischen Messung für alle Fließmittelkombinationen bis auf zwei noch unterhalb der Herstellerangabe von $5 \cdot 10^{-5}$ AU. Die Kombinationen von Acetonitril und Phosphatpuffer lagen beide bei rund $5,5 \cdot 10^{-5}$ AU [Abb. 4-13.], was immer noch ein ausgezeichnetes Ergebnis ist.

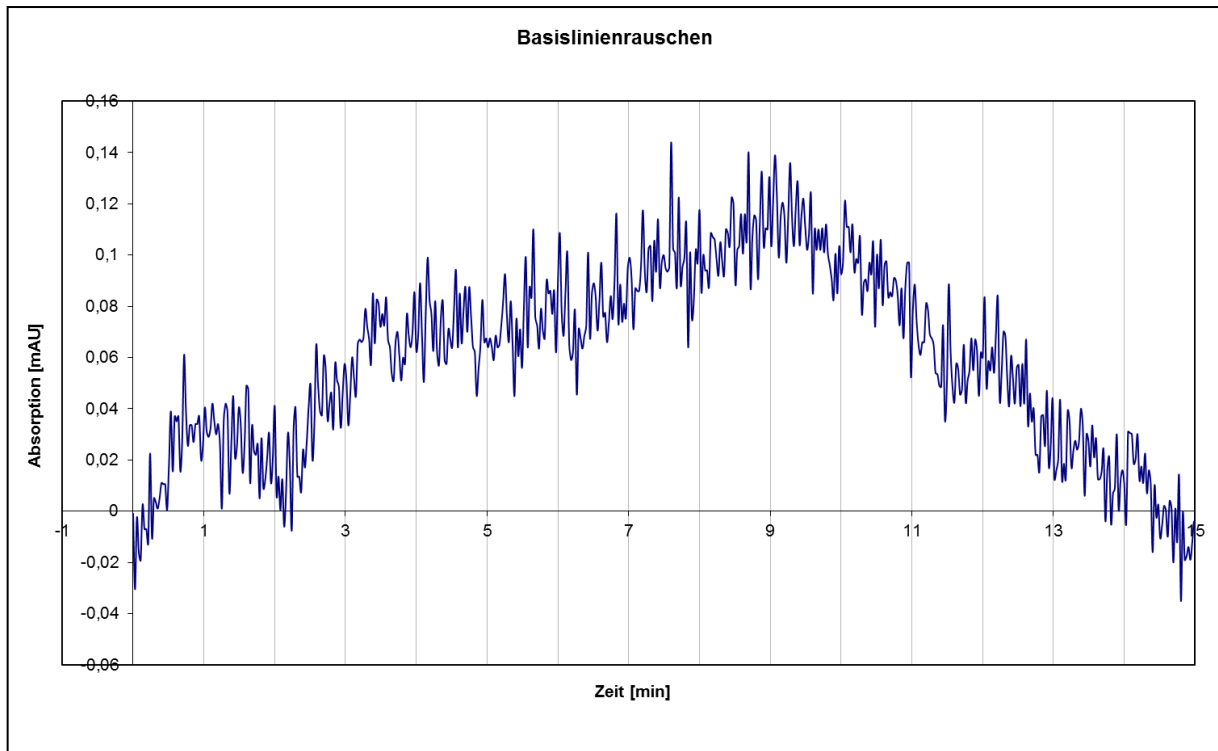


Abb. 4-13: Das statische Detektorrauschen bei Verwendung einer normalen Durchflussszelle und einer mobilen Phase bestehend aus 20% Acetonitril und 80% Phosphatpuffer. Mit $5,47 \cdot 10^{-5}$ AU liegt es zwar leicht über der Herstellerangabe, ist aber dennoch ein sehr gutes Ergebnis.

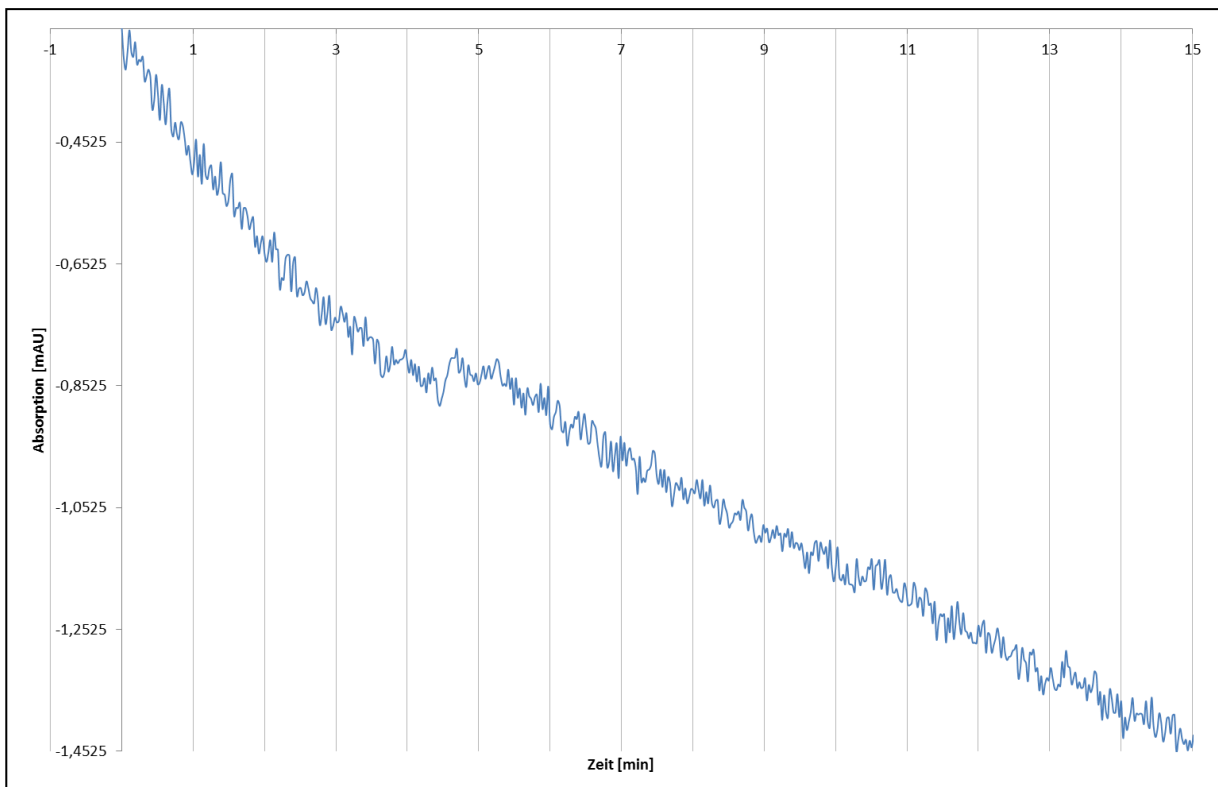


Abb. 4-14: Das dynamische Detektorrauschen bei Verwendung von Wasser und einer Flussrate von 2,0 ml/min. Gegenüber dem statischen Rauschen mit Wasser hat es sich um annähernd Faktor 2 verschlechtert und liegt bei $7,38 \cdot 10^{-5}$ AU.

Im nächsten Schritt wurde die Auswirkung einer nicht statischen (dynamischen) Messung mit fließender mobiler Phase (reines Wasser) auf das Rauschen (vgl. 2.2.5.3.) untersucht. Bereits bei niedrigen Flussraten (2,0 ml/min) konnte eine Verschlechterung um etwa den Faktor 2 beobachtet werden [Abb. 4-14.].

Die fließende mobile Phase wird in der Durchflusszelle verwirbelt. Cabooter et al. haben in ihrer Arbeit über dieses Phänomen bewiesen, dass diese Turbulenzen mit dem Detektorrauschen korrelieren und dass mit steigender Flussrate auch das Rauschen steigt [85]. Ab einer Flussrate von ca. 1,8 ml/min bis 2,5 ml/min steigt das Rauschen sprunghaft auf etwa das 20-fache des statischen Rauschens an. Ab 2,5 ml/min aufwärts stagniert es allerdings [Abb. 4-15.].

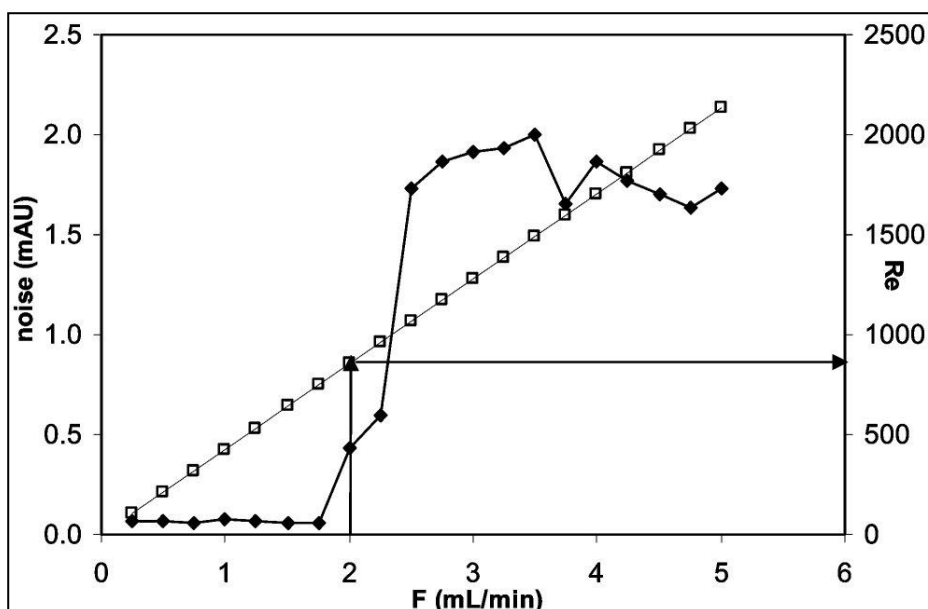


Abb. 4-15: Die Graphik aus Cabooter et al. zeigt deutlich den sprunghaften Anstieg des Rauschens zwischen 1,8 und 2,5 ml/min. Bei höheren Flussraten stagniert es. Selbst sehr hohe Flussraten verschlechtern das Rauschen um nicht mehr als eine Zehnerpotenz.

Langzeitdaten aus unseren eigenen Arbeiten [86, 87] mit monolithischen Säulen und hohen Flussraten bestätigen diese Ergebnisse. Selbst unter widrigen Bedingungen, mit einer normalen Durchflusszelle, einer mobilen Phase und sogar sehr hoher Flussrate wird das Detektorrauschen nur um etwa eine Zehnerpotenz verschlechtert. In unseren Versuchen lag es nie oberhalb von $7 \cdot 10^{-4}$ AU [Abb. 4-16.].

Ausgehend von Hubers und Welebobs generellem Limit und den Erkenntnissen aus Cabooters und unseren eigenen Arbeiten lässt sich eine neue Akzeptanzgrenze für das dynamische Detektorrauschen mit $2,0 \cdot 10^{-3}$ AU festlegen.

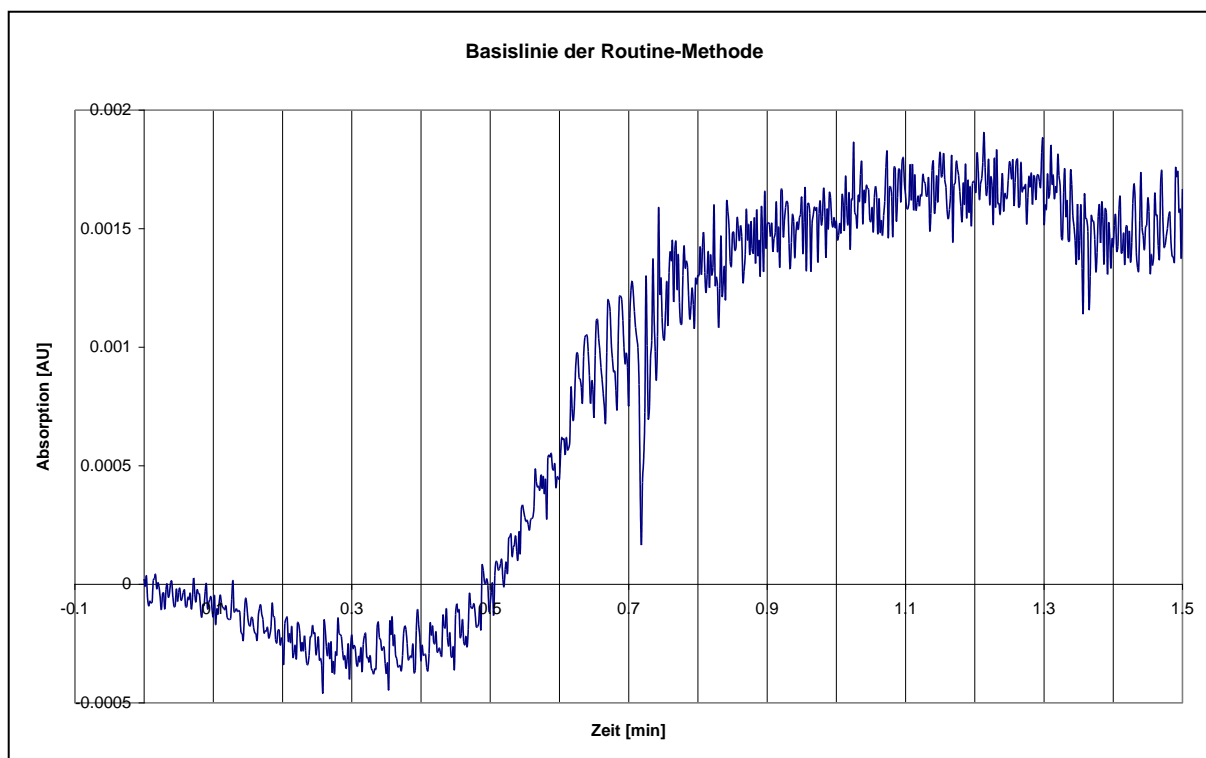


Abb. 4-16: Die Basislinie erhalten nach einer Leerinjektion während der Durchführung der Routine-Methode. Die Gesamtdauer der Analyse betrug 1,5 min. Man sieht deutlich, dass zwischen 0,6 und 0,8 min die Flussrate stark erhöht wurde. Das Rauschen ist im hinteren Abschnitt zwar stärker, bleibt aber bei Flussraten von 7,0 – 9,9 ml/min konstant und liegt nie höher als $7,0 \cdot 10^{-4}$ AU.

Berücksichtigt man, dass selbst unter ungünstigen Bedingungen und einer dynamischen Messung das Rauschen sich gegenüber einer klassischen Messung maximal verzwanzigfacht, so entspricht diese Grenze einem Wert von $1,0 \cdot 10^{-4}$ AU für statisches Rauschen. Es ist also ein guter und vor allem sehr gut erreichbarer Kompromiss zwischen den Angaben des Herstellers und Hubers Vorschlag. Mit modernen Geräten sind bessere Werte sehr wahrscheinlich, schlechtere würden jedoch die Messergebnisse der Methode negativ beeinflussen.

Als Faustregel lässt sich festhalten: Wird die Herstellerangabe für das statische Rauschen mit 20 multipliziert, lässt sich abschätzen, wie hoch das dynamische Rauschen unter realen Bedingungen sein wird.

Das Driften der Basislinie wird klassisch genauso wie das Rauschen bestimmt, nur über einen längeren Zeitraum von einer Stunde. Dabei sollte die Linie nicht mehr als $5,0 \cdot 10^{-3}$ AU/h nach oben oder unten abwandern. In unseren Versuchen hat sich gezeigt, dass die verschiedenen mobilen Phasen und Flussraten keinen Einfluss auf die Drift haben. Im ungünstigsten Fall wurde ein Ergebnis von $3,0 \cdot 10^{-3}$ AU/h erzielt. Das ist nicht viel schlechter als das beste Ergebnis bei statischer Messung.

Dieses Wert gilt allerdings nicht beim Einsatz eines Fließmittelgradienten oder eines Flussprogramms [Abb. 4-16.].

Beide Parameter können also in der Regel holistisch während eines SSTs überprüft werden.

4.4.2.3. Holistische OQ/PQ – Über RSD% bestimmbare Parameter

Die Bestimmung von Präzisionsparametern, zu denen die *Präzision des Injektionsvolumens*, *Flussratenpräzision* und die *Temperaturpräzision des Säulenofens* gehören, erfolgt nicht über spezielle Tests, sondern wird über die Standardabweichung der Retentionszeiten bzw. der Peakflächen durchgeführt. Die *Richtigkeit des Gradientenmischers* kann im holistischen Ansatz ausnahmsweise ebenfalls zu den RSD%-abhängigen Parametern gezählt werden (siehe Abschnitt 4.4.2.1. *Richtigkeit des Gradientenmischers*).

Die *Flussratenpräzision* und die *Temperaturpräzision* werden beide über die RSD% der Retentionszeiten ermittelt. Hier gilt: Bleibt die RSD% unterhalb der Akzeptanzgrenze von 1,0% (oder einer anderen, selbst definierten Grenze), so weiß man, dass sowohl die Pumpe bei jedem Lauf gleich stark pumpt, als auch dass die Temperatur im Säulenofen konstant ist. Im Falle einer zunehmenden Streuung müssen wieder beide Bauteile gründlich untersucht werden, da sich der Fehler zunächst nicht eingrenzen lässt. Dementsprechend muss auch der Gradientenmischer untersucht werden, da seine Fehlfunktion nicht nur zu verschobenen, sondern auch zu streuenden Retentionszeiten führen kann.

Für die *Präzision des Injektionsvolumens* wird die Streuung der Peakflächen herangezogen. Ist diese gering ($< 1,0\%$), so bedeutet dies, dass der Injektor jedes Mal annähernd die gleiche Menge injiziert.

In der klassischen OQ/PQ werden für diesen Zweck Retentions- und Peakdaten von Standards wie Coffein [80], Uracil aber auch Methyl- oder Propylparaben [88] genutzt. Wie bereits in Abschnitt 4.4.2.1. stellt sich aber auch hier die berechnete Frage, ob diese Informationen nicht auch mit anderen Substanzen im Laboralltag gewonnen werden können.

Die Antwort darauf ist leider nicht ganz trivial. Dafür muss überprüft werden, ob Systemeignungstests Retentions- und Peakflächendaten von mindestens gleich hoher Qualität liefern, wie die herkömmlichen OQ- und PQ-Methoden. Nur in diesem Fall ist es möglich diese Daten für eine Parameterbewertung heranzuziehen.

Abschließend kann nun eine überarbeitete Parameterliste für die kontinuierliche PQ präsentiert werden [Tab. 4-4.].

Tab. 4-4: Zwölf holistische Parameter, die essentiell für eine gründliche Qualifizierung eines HPLC Gerätes sind. Die mit a) gekennzeichneten Werte repräsentieren jeweils die schlechtesten, während des erweiterten SSTs erhaltenen Ergebnisse. Diese Zusammenstellung genügt auch den EDQM-Spezifikationen [89]

Modul	Parameter	Durchführung	Toleranz	Gefundener Wert
Injektor	Präzision des Injektionsvolumens	Bestimmung der RSD% von Peakflächen	<1.0% RSD	0.99% ^{a)}
	Linearität des Injektionsvolumens	Bestimmung durch sukzessive Steigerung des Injektionsvolumens (1,10,20,50,100µl) und anschließende Messung der Peakflächenzunahme	$R^2 \geq 0.999$	0.9998
	Probenverschleppung (Injection Carryover)	Bestimmung durch Injektion einer Blindprobe direkt nach einer Analyse und Bestimmung einer eventuellen Absorption	Methoden spezifisch	Keine Verschleppung
Probengeber	Präzision der Thermostatisierung	Temperaturmessung mit einem Thermometer über eine definierte Zeitperiode. <i>Nur für thermostatisierbare Probengeber sinnvoll</i>	$\pm 2^\circ\text{C}$	Nicht gemessen
Pumpsystem	Richtigkeit der Flussrate	Messung des Volumenflusses der mobilen Phase durch die Säule über eine definierte Zeitspanne. (1.0 ml/min für 10 min, 2.0 ml/min für 5 min and 2.5 ml/min für 10 min)	Erwartetes Volumen $\pm 3\%$	Erwartetes Volumen $\pm < 0.5\%$
	Richtigkeit des Gradientenmischers	Kann kontinuierlich anhand der Retentionszeiten und ihrer Streuung überwacht werden. Wenn unerwartete Abweichungen bemerkt werden, sollte unbedingt ein klassischer Gradiententest durchgeführt werden.		
	Präzision der Flussrate	Bestimmung der Streuung der Retentionszeiten.	<1.0% RSD	0.88% ^{a)}
Detektor	Richtigkeit der Wellenlänge	Messung des UV Spektrums einer Substanz	Spezifische Maxima ± 2	Spezifische Maxima ± 0.4

		der Analyse und Vergleich gegen eine Referenz.	nm	nm
	Rauschen	Dynamisch Messung (bei angeschalteter Pumpe) der mobilen Phase für 15 min	$< 2 \cdot 10^{-3}$ AU (für dynamisches Rauschen)	$5 \cdot 10^{-4}$ AU
	Drift	Dynamisch Messung (bei angeschalteter Pumpe) der mobilen Phase für eine Stunde	$< 5 \cdot 10^{-3}$ AU/h	$3.5 \cdot 10^{-3}$ AU/h
	Linearität der Detektorantwort	Bestimmung, wie die Linearität des Injektionsvolumens.	$R^2 \geq 0.999$	0.9998
Säulenofen	Präzision der Thermostatierung	Bestimmung der Streuung der Retentionszeiten.	$< 1.0\%$ RSD	0.88% ^{a)}

4.4.2.4. Der Systemeignungstest (System Suitability Test = SST)

Zuerst soll geklärt werden, was überhaupt ein SST ist, wofür er gedacht ist und warum es einen großen Vorteil brächte seine Daten für die Qualifizierung zu nutzen. Sowohl das Ph.Eur. als auch die USP und die ICH geben für den SST ähnliche Definitionen:

„Prüfungen der Systemeignung (Eignungsprüfung) bilden einen wesentlichen Bestandteil der Methode und werden angewendet, um eine angemessene Trennleistung des Chromatographiesystems zu gewährleisten. Effizienz, Massenverteilungsverhältnis, Auflösung, relative Retention und Symmetriefaktor sind gewöhnlich angegebene Parameter zur Beurteilung der Leistungsfähigkeit der Säule.“ [Ph.Eur 6.4, Kap. 2.2.46, Systemeignung (Eignungsprüfung)]

“System suitability tests are an integral part of gas and liquid chromatographic methods. They are used to verify that the detection sensitivity, resolution and reproducibility of the chromatographic system are adequate for the analysis to be done. The tests are based on the concept that the equipment, ...constitute an integral system that can be evaluated as such.” [USP-NF 31, <621>]

“System suitability testing is an integral part of many analytical procedures. The tests are based on the concept that the equipment, electronics, analytical operations and samples to be analyzed constitute an integral system that can be evaluated as such. System suitability test parameters to be established for a particular procedure depend on the type of procedure being validated. See Pharmacopoeias for additional information.” [ICH guideline Q2 (R1) 9. System Suitability Testing].

Aus den Definitionen wird der Zweck eines SSTs deutlich, nämlich zu gewährleisten, dass ein Gerät in seiner momentanen Konfiguration in der Lage ist die gewünschte Methode korrekt auszuführen. In allen drei Beschreibungen finden sich holistische Prüfungen für methodenbezogene Parameter, wie Trennleistung, Auflösung und Empfindlichkeit, aber auch die Reproduzierbarkeit wird untersucht. Zusätzliche Parameter können und müssen bei Bedarf leicht mituntersucht werden.

Je nachdem, ob es sich bei der Methode um eine Gehaltsbestimmung, eine Reinheits- oder Identitätsprüfung handelt, ist ihr SST anders aufgebaut. Nachfolgend wird beispielhaft ein typischer Systemeignungstest, integriert in eine Analysensequenz einer Gehaltsbestimmung vorgestellt.

- mind. 1 x Aufschlussmittel (Leerinjektion für den Blindwert)
 - 5 x Standard A 100 %
 - 2 x Standard B 100 %
 - 1 x Aufschlussmittel
 - ≤ 10 x Injektionen der Probelösungen
 - 1 x Standard A 100 % (⇒ Driftkontrolle)
 - ≤ 10 x Injektionen der Probelösungen, ggf.
 - 1 x Standard A 100 % (⇒ Driftkontrolle)
 - ... usw. ...
 - 1 x Standard A 100 % (⇒ Driftkontrolle)
- } SST

Die Standards A und B sind unabhängig voneinander gemachte Einwaagen des zu untersuchenden Wirkstoffes, welche in ihrer Konzentration in etwa dem Sollwert der Probe entsprechen. Der zwischen den Analysenserien injizierte Standard A (Driftkontrolle) soll prüfen, ob die Peakflächen und Retentionszeiten stabil bleiben.

Hier wird noch einmal deutlich, dass der SST neben der Eignung des Gerätes für eine bestimmte Methode gleichzeitig auch die Systemleistung überprüft, weswegen er bereits heute als Indikator für ein stabil laufendes System genutzt wird. Es ließen sich leicht zusätzliche Tests zwischen den Analysenläufen integrieren, beispielsweise Rausch- und Driftkontrolle des Detektors während der Leerinjektionen. Wenn die Tests, wie vorgestellt holistisch und zudem mit der laufenden Methode durchgeführt würden, würde dies den SST nur ein wenig verlängern, da keine Teile oder Fließmittel ausgewechselt werden müssten. Auf der anderen Seite aber brächten die zusätzlichen Informationen einen erheblichen Zugewinn an Datensicherheit mit sich, was die klassische PQ obsolet machen würde. Auf lange Sicht würde sich also so ein erweiterter SST schnell lohnen.

4.4.3. SST vs. PQ: Ist die Datenqualität gleichwertig?

Die Nutzung der Präzisionsdaten der SSTs für eine Qualifizierungsbeurteilung ist nicht selbstverständlich. SSTs haben in der Regel deutlich weniger stringente Akzeptanzgrenzen, die zum Nachweis der Systemeignung für eine bestimmte Methode ausreichen. Sie können von Methode zu Methode variieren. Es ist somit durchaus möglich, dass die gewählte Methode noch innerhalb der Parameter läuft, obwohl nicht alle Bauteile des Systems absolut einwandfrei funktionieren. Deswegen kann und darf bei Bestehen eines SSTs nicht automatisch von einem qualifizierten Gerät ausgegangen werden. Auf der anderen Seite können nicht ohne weiteres die Akzeptanzgrenzen verschärft werden, weil dies die Gefahr von OOS-Ergebnissen erhöhen könnte, da bislang nicht bekannt ist, ob SSTs überhaupt Daten von solch hoher Qualität liefern können. Um das zu untersuchen, wurde im kleinen Maßstab ein Pilotprojekt, in dem unsere eigenen PQ- und SST-Daten verglichen wurden, durchgeführt. Dafür wurde der zweiseitige F-Test benutzt. Dabei handelt es sich um einen statistischen Test, dessen Teststatistik der Fisher-Verteilung folgt und der dazu dient die Varianzen (Gl. 17) zweier Populationen (Stichproben oder Grundgesamtheiten) auf signifikante Unterschiede hin zu überprüfen. Unterscheiden sich zwei Populationen bereits signifikant in ihren Varianzen, so unterscheiden sie sich auch allgemein. Im Umkehrschluss bedeutet das in unserem Fall, dass wenn die Varianzen der Retentionszeiten und Peakflächen der PQ-Methode sich von denen des SSTs der Routinemethode nicht signifikant unterscheiden, die Methoden dann Daten von gleicher Qualität liefern.

4.4.3.1. Der F-Test

Der klassische F-Test ist ein Hypothesentest und gehört zu der Gruppe der Likelihood-Quotienten-Tests. Das bedeutet, es wird eine Nullhypothese (H_0) (Gl. 22) aufgestellt, die entweder angenommen, oder zugunsten einer Alternativhypothese (H_1) (Gl. 23) verworfen (= engl. to nullify → Nullhypothese) werden kann. Bei dem F-Test unterstellt die Nullhypothese Gleichheit von Sachverhalten, während bei Annahme der Alternativhypothese mit einer definierten Irrtumswahrscheinlichkeit α (in der Regel 5%) auf einen signifikanten Unterschied geschlossen werden muss.

$$H_0 : \hat{\sigma}_1^2 = \hat{\sigma}_2^2 \quad (\text{Gl. 22})$$

$$H_1 : \hat{\sigma}_1^2 \neq \hat{\sigma}_2^2 \quad (\text{Gl. 23})$$

Als Teststatistik wird der F-Wert, welcher der Fisher-Verteilung folgt und abhängig von der Irrtumswahrscheinlichkeit und den zu Verfügung stehenden Freiheitsgraden entweder aus Tabellenwerken abgelesen oder mathematisch errechnet werden kann, verwendet. Er wird als kritischer F-Wert (F_{crit}) bezeichnet. Mit diesem Wert wird der Quotient der Varianzen (= Prüfwert T_F) verglichen (Gl. 24). Dabei ist darauf zu achten, dass der Quotient ≥ 1 ist, also die größere Varianz immer im Zähler steht. Gilt $F_0 \leq F_{\text{crit}}$, so wird H_0 angenommen, ansonsten H_1 [Abb. 4-17.].

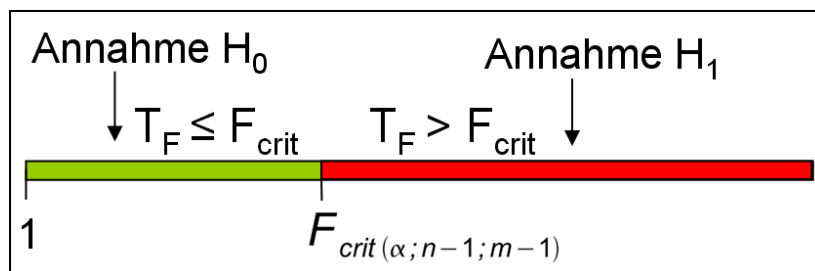


Abb. 4-17: Veranschaulichung der Annahme oder Ablehnung von H_0 bzw. H_1 . F_{crit} ist abhängig von der Irrtumswahrscheinlichkeit α und den Freiheitsgrade $n-1$ und $m-1$. n und m sind die Stichprobengrößen der Varianzen.

$$T_F = \frac{\hat{\sigma}_2^2}{\hat{\sigma}_1^2} \text{ wobei gilt : } \hat{\sigma}_2^2 \geq \hat{\sigma}_1^2 \quad (\text{Gl. 24})$$

$$T_{F(\text{skaliert})} = \frac{RSD\%_2^2}{RSD\%_1^2} \text{ wobei gilt : } RSD\%_2^2 \geq RSD\%_1^2 \quad (\text{Gl. 25})$$

$T_{F(\text{skaliert})}$ = Anstatt von Varianzen sind hier quadrierte relative Standardabweichungen eingesetzt.

An dieser Stelle muss darauf hingewiesen werden, dass nur die Annahme von H_1 statistisch abgesichert ist. Das heißt, dass mit der gegebenen Irrtumswahrscheinlichkeit (α) bzw. Annahmewahrscheinlichkeit ($1-\alpha$) nur ein signifikanter Unterschied der Varianzen festgestellt werden kann. Auf Gleichheit kann bei Annahme von H_0 hingegen nicht geschlossen werden [90]. Dies ist nur mit Äquivalenztests, wie sie z.B. in Bioäquivalenzstudien oder beim Methodentransfer eingesetzt werden möglich [28, 91, 92].

In unserem Fall war ohnehin bekannt, dass die Daten nicht zu einer Grundgesamtheit gehören, also reichte die Information, dass sie sich nicht signifikant voneinander unterscheiden. Ein Nachweis von Gleichheit war nicht nötig.

4.4.3.2. Das Pilotprojekt

Ziel des Pilotprojektes war es in einem kleineren Labormaßstab die Datenqualität von PQ-Methoden mit der von SSTs zu vergleichen. Für die PQ-Methode wurde das bereits in Abschnitt 4.4.1. erwähnte PQ-Testgemisch bestehend aus Progesteron und Anthracen verwendet. Thioharnstoff diente bei dieser von Merck® für die PQ vorgeschlagenen Methode als Totzeitmarker. Der SST wurde von unserer Routinemethode (Glibenclamid, Glimepirid und zwei Abbauprodukte; siehe Abschnitt 4.4.1.) abgeleitet.

Um statistisch aussagekräftige Datensätze zu erhalten, wurde für den Vergleich das Gerät mit beiden Methoden jeweils vier Mal komplett qualifiziert. Bei jeder Qualifizierung wurde das entsprechende Testgemisch fünf Mal hintereinander injiziert. Für jede dieser Serien wurde die Varianz ($\hat{\sigma}^2$) nach Gl. 17 berechnet. Die Varianzen aus den je vier zusammenhängenden Serien wurden anschließend gepoolt. Das bedeutet, es wurde eine Gesamtvarianz ($\hat{\sigma}_{pool}^2$) berechnet, um eine höhere Signifikanz ($n = 20$, anstatt $n = 5$) der Datensätze zu erreichen (Gl. 26).

$$\hat{\sigma}_{pool}^2 = \frac{\sum_{i=1}^n FG_i \cdot \hat{\sigma}_i^2}{\sum_{i=1}^n FG_i} \quad (\text{Gl. 26})$$

FG = Freiheitsgrade (in diesem Fall Stichprobenumfang – 1)

Da die Ergebnisse der PQ-Methode und des SST andere Absolutwerte lieferten, musste für den Vergleich zuerst eine Skalierung von $\hat{\sigma}_{PQ}^2$ und $\hat{\sigma}_{SST}^2$ auf $\text{RSD}\%_{PQ}$

und $RSD\%_{SST}$ vorgenommen werden. Analog zu Gl. 26 lässt sich mit der $RSD\%$ auch eine skalierte, relative Gesamtvarianz ($RSD\%^2_{pool}$) abbilden.

Auf diese Weise wurden die Gesamtvarianzen für t_R und AUC eines jeden Peaks beider Methoden gebildet [Tab. 4-5] und miteinander verglichen [Tab. 4-6.]. Ein Rechenbeispiel ist in Abbildung 4-18. gegeben.

Tab. 4-5: Eine Zusammenstellung der Daten aus dem Pilotprojekt. Jede Serie bestand, analog zu den PQ-SOPs [80, 82] und SST Arzneibuchforderungen [42, 46] aus 5 Injektionen ($3 \leq x \leq 6$). Die mit a) gekennzeichneten Varianzen wurden für das Rechenbeispiel [Abb. 4-18.] benutzt.

Substanz	Serie PQ	AUC	$\hat{\sigma}$	RSD%	RSD% ²	RSD% ² _{pool}
Progesteron	1	408154	0,2507	0,6141	0,3772	0,1630 ^a
	2	405820	0,0421	0,1038	0,0108	
	3	405870	0,1733	0,4269	0,1823	
	4	405964	0,1162	0,2863	0,0820	
Anthracen	1	512164	0,2362	0,4611	0,2126	0,2189
	2	515506	0,1880	0,3648	0,1331	
	3	514448	0,3447	0,6701	0,4490	
	4	514554	0,1464	0,2844	0,0809	

Substanz	Serie SST	AUC	$\hat{\sigma}$	RSD%	RSD% ²	RSD% ² _{pool}
Abbauprodukt a	1	233150	0,1044	0,4476	0,2004	0,3281 ^a
	2	231490	0,0646	0,2789	0,0778	
	3	231724	0,0760	0,3279	0,1075	
	4	231362	0,2227	0,9627	0,9267	
Abbauprodukt b	1	214570	0,0915	0,4263	0,1818	0,2712
	2	216444	0,0841	0,3886	0,1510	
	3	215222	0,1460	0,6785	0,4604	
	4	215898	0,1166	0,5400	0,2916	
Glibenclamid	1	296072	0,1142	0,3856	0,1487	0,2704
	2	295890	0,1289	0,4356	0,1898	
	3	295002	0,1623	0,5501	0,3026	
	4	294504	0,1955	0,6638	0,4406	

4. Qualifizierung Analytischer Instrumente

Glimepirid	1	257408	0,2362	0,9177	0,8422	0,3012
	2	256398	0,1047	0,4083	0,1667	
	3	258250	0,0741	0,2870	0,0824	
	4	258436	0,0871	0,3369	0,1135	

Substanz	Serie PQ	t _R	$\hat{\sigma}$	RSD%	RSD% ²	RSD% ² _{pool}
Progesteron	1	2,05	0,0059	0,2857	0,0816	0,0521
	2	2,05	0,0048	0,2355	0,0555	
	3	2,05	0,0038	0,1845	0,0340	
	4	2,05	0,0040	0,1933	0,0374	
Anthracen	1	3,27	0,0083	0,2548	0,0649	0,0409
	2	3,28	0,0058	0,1759	0,0309	
	3	3,29	0,0063	0,1913	0,0366	
	4	3,28	0,0058	0,1765	0,0312	

Substanz	Serie SST	t _R	$\hat{\sigma}$	RSD%	RSD% ²	RSD% ² _{pool}
Abbauprodukt a	1	0,53	0,0013	0,2529	0,0640	0,0918
	2	0,52	0,0018	0,3435	0,1180	
	3	0,52	0,0016	0,3047	0,0928	
	4	0,52	0,0016	0,3041	0,0925	
Abbauprodukt b	1	0,64	0,0021	0,3325	0,1106	0,0870
	2	0,63	0,0018	0,2848	0,0811	
	3	0,62	0,0018	0,2933	0,0860	
	4	0,62	0,0016	0,2655	0,0705	
Glibenclamid	1	1,13	0,0034	0,2971	0,0882	0,0953
	2	1,12	0,0042	0,3715	0,1380	
	3	1,12	0,0028	0,2532	0,0641	
	4	1,11	0,0033	0,3012	0,0907	
Glimepirid	1	1,29	0,0045	0,3456	0,1194	0,0875
	2	1,27	0,0051	0,4031	0,1625	

	3	1,24	0,0019	0,1568	0,0246	
	4	1,24	0,0026	0,2084	0,0434	

Tab. 4-6: Die gepoolten Varianzen jedes Peaks aus der PQ- und SST-Methode wurden mit dem F-Test verglichen. Es wurde jedes Mal zugunsten der Nullhypothese entschieden, weshalb von einem nicht signifikanten Unterschied der Datenqualität ausgegangen werden kann.

AUC_{PQ}: AUC_{SST}	T_F	F_{crit}	H₀ oder H₁ angenommen
Abbauprodukt a : Progesteron	2,0123	2,3335	H ₀
Abbauprodukt a : Anthracen	1,4989	2,3335	H ₀
Abbauprodukt b : Progesteron	1,6631	2,3335	H ₀
Abbauprodukt b : Anthracen	1,2388	2,3335	H ₀
Glibenclamid : Progesteron	1,6586	2,3335	H ₀
Glibenclamid : Anthracen	1,2354	2,3335	H ₀
Glimepirid : Progesteron	1,8474	2,3335	H ₀
Glimepirid : Anthracen	1,3760	2,3335	H ₀

t_{R(PQ)}: t_{R(SST)}	T_F	F_{crit}	H₀ oder H₁ angenommen
Abbauprodukt a : Progesteron	1,7611	2,3335	H ₀
Abbauprodukt a : Anthracen	2,2449	2,3335	H ₀
Abbauprodukt b : Progesteron	1,6696	2,3335	H ₀
Abbauprodukt b : Anthracen	2,1284	2,3335	H ₀

Glibenclamid : Progesteron	1,8275	2,3335	H ₀
Glibenclamid : Anthracen	2,3296	2,3335	H ₀
Glimepirid : Progesteron	1,6780	2,3335	H ₀
Glimepirid : Anthracen	2,1390	2,3335	H ₀

Die folgende Abbildung soll noch einmal die Berechnung, die zu Annahme oder Ablehnung der Nullhypothese führt, verdeutlichen.

$$T_{F(\text{skaliert})} = \frac{RSD\%^2_{\text{pool}_2}}{RSD\%^2_{\text{pool}_1}} = \frac{0,3281}{0,1630} = 2,0123$$

$$F_{\text{crit}(0,05;16;16)} = 2,3335$$

Wenn gilt: $T_{F(\text{skaliert})} \leq F_{\text{crit}}$, dann wird H_0 angenommen

Abb. 4-18: Für dieses Rechenbeispiel wurden die am weitesten voneinander liegenden Gesamtvarianzen aus Tab. 4-3. ausgewählt. Für F_{crit} wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% und je 16 ($4 \cdot (5-1)$) Freiheitsgraden gewählt.

Die Vermutung, dass die Datenqualität, die die PQ-Methode liefert, sich nicht signifikant von der der SST-Methode unterscheidet, wurde in diesem Experiment bestätigt. Bei unserem HPLC Gerät macht es also keinen Unterschied, ob die AUC oder t_R -abhängigen Präzisionsparameter mit der vom Hersteller vorgeschlagenen, oder mit der Routinemethode bestimmt werden, da die Ergebnisse gleich gut sind.

4.4.3.3. Ausweitung des Projekts auf Daten von Kooperationspartnern

Der sehr zufriedenstellende Verlauf des Pilotprojekts führte zu einer Ausweitung des Projekts auf Langzeit-PQ- und SST-Datensätze von verschiedenen an der Fragestellung interessierten Kooperationspartnern. Im Verlauf dieser Kooperation wurden uns von sechs Pharmazeutischen Unternehmen (Original- und Lohnherstellern) sowie von einem Auftragslabor SST-Datensätze bestimmter HPLC-Geräte zur Verfügung gestellt, die einen Zeitraum von zwei bis fünf Jahren abdeckten. Zusätzlich wurden die in diesem Zeitraum auf diesen Geräten angefallenen PQ-Daten bereitgestellt. Da in der Realität naturgemäß, anders als in dem generischen Pilotprojekt, deutlich mehr SST- als PQ-Daten anfallen, war eine

sinnvolle Gruppierung einzelner Datenserien nötig, bevor mit der Auswertung begonnen werden konnte. In der Regel wird bei den PQ-Testungen eine Serie von 6 ($3 \leq x \leq 6$) Injektionen [80, 82] zur Bestimmung der AUC- und t_R -Präzision durchgeführt, so dass aus zwei bis acht PQ-Testungen, die in den Zeiträumen pro Gerät stattfanden, Datenumfänge von $n = 10$ bis $n = 40$ gepoolt werden konnten. Die über die Zeit aufgenommenen SSTs wurden in solche Serien zusammengefasst, dass galt: $n_{SST} \approx n_{PQ} \approx 10 - 40$. Auf diese Weise wurde eine optimale Vergleichbarkeit geschaffen. Die Auswertung erfolgte, wie bei dem Pilotprojekt mittels F-Test. Die Ergebnisse eines Kooperationspartners sollen nachfolgend beispielhaft präsentiert werden [Tab. 4-7a,b.].

Tab. 4-7a: ein Zweimonatsauszug aus den SST-Daten eines Kooperationspartners. Jeder AUC-Mittelwert besteht aus 6 Injektionen des Analytstandards.

Datum	AUC	RSD% _{AUC}	RSD% ² _{AUC}	RSD% ² _{pool}
04.07.2003	1559852	2,10	4,410	1,060
17.07.2003	1463049	0,72	0,518	
07.08.2003	1452721	0,44	0,194	
22.08.2003	1502517	0,24	0,058	
25.08.2003	1490865	0,35	0,123	

Tab. 4-7b: Die zusammengefassten PQ-Daten desselben Gerätes, gesammelt über einen Zeitraum von 5 Jahren. Auch hier bestehen die Mittelwerte aus 6 aufeinanderfolgenden Injektionen.

Datum	AUC	RSD% _{AUC}	RSD% ² _{AUC}	RSD% ² _{pool}
03.01.2008	1441414	1,275	1,626	1,410
11.12.2006	1486462	1,639	2,686	
06.12.2005	1439765	0,819	0,671	
16.12.2003	1439279	0,264	0,070	
13.03.2003	1554491	1,414	1,999	

Die SST-Daten zwischen Juli 2003 und März 2008 wurden jeweils zu Zweimonatsdatensätzen [wie in Tab. 4-7a.] zusammengefasst und gepoolt, wodurch 35 Sätze mit je $n = 30$ entstanden. Jeder dieser Datensätze wurde mit dem

gepoolten PQ-Datensatz verglichen. Als kritischer F-Wert wurde für diesen Vergleich

$$F_{crit(0,05;25;25)} = 1,9554 \text{ berechnet.}$$

In 28 von 35 Fällen wurde kein signifikanter Unterschied der Daten festgestellt. In sieben Fällen allerdings musste zugunsten von H_1 entschieden werden, da die Unterschiede der Varianzen nicht mehr auf zufällige Streuung zurückgeführt werden konnten. Dies war dennoch kein Fehlschlag, da sich bei einer näheren Untersuchung dieser Daten herausstellte, dass die beteiligten SST-Daten immer die signifikant besseren waren. Das heißt, dass in diesen Fällen der SST sogar Informationen von höherer Qualität als die PQ lieferte.

Insgesamt wurden 75 solcher zusammengefassten Datenblöcke analysiert. Dabei wurde 17 Mal ein signifikanter Unterschied der Varianzen festgestellt, bei neun davon aufgrund eines signifikant besseren SSTs. In acht Datensätzen waren folglich die SSTs schlechter als die PQ. Jedoch konnte jeder einzelne SST, der zu einer Varianzerhöhung seines Datenblocks führte, von den jeweiligen Kooperationspartnern mit eingeschränkter Systemleistung zu der Zeit erklärt werden, die eben durch diese schlechten SST-Ergebnisse angedeutet und durch eine außerplanmäßige PQ bestätigt wurde.

Die Untersuchungen während des Projekts haben absolut bestätigt, dass SST-gegenüber PQ-Daten Informationen von mindestens gleicher und manchmal sogar besserer Qualität liefern. Das mag auf den ersten Blick bemerkenswert erscheinen, es spiegelt allerdings nur den sehr hohen Standard der heutigen Methodenentwicklung und die große Erfahrung der Benutzer mit ihren Routinemethoden wieder. Ferner wurde erneut bestätigt, dass schlecht laufende SSTs durchaus bereits heute als Indikator eines möglichen Systemversagens genutzt werden.

4.4.3.4. Kontrollkarten in der PQ

Kontroll- oder auch Regelkarten sind Werkzeuge der statistischen Prozesslenkung. Sie werden im Bereich der Pharmazeutischen Qualitätskontrolle sehr häufig genutzt, um schnell erfassen zu können, ob ein Prozess noch der statistischen Kontrolle unterliegt. Dazu werden um den Sollwert jeweils eine untere und eine obere Warn-, sowie Stoppgrenze (Eingriffsgrenze) gezogen. Trägt man nun im Laufe der Zeit einzelne Messwerte in das Diagramm ein, wird schnell ein möglicherweise vorhandener Trend erkannt und es können geeignete Gegenmaßnahmen ergriffen werden.

Auch in der PQ ist der Einsatz solcher Regelkarten möglich, aber nur dann sinnvoll, wenn genügend Daten eingetragen werden können. Dies ist dann der Fall, wenn die kontinuierliche PQ Anwendung findet. Im Moment gibt es hierfür noch keine konkreten Vorgaben, deshalb sollen nachfolgend lediglich Beispiele eine mögliche Konfiguration eine PQ-Regelkarte [Abb. 4-19a,b.] zeigen.

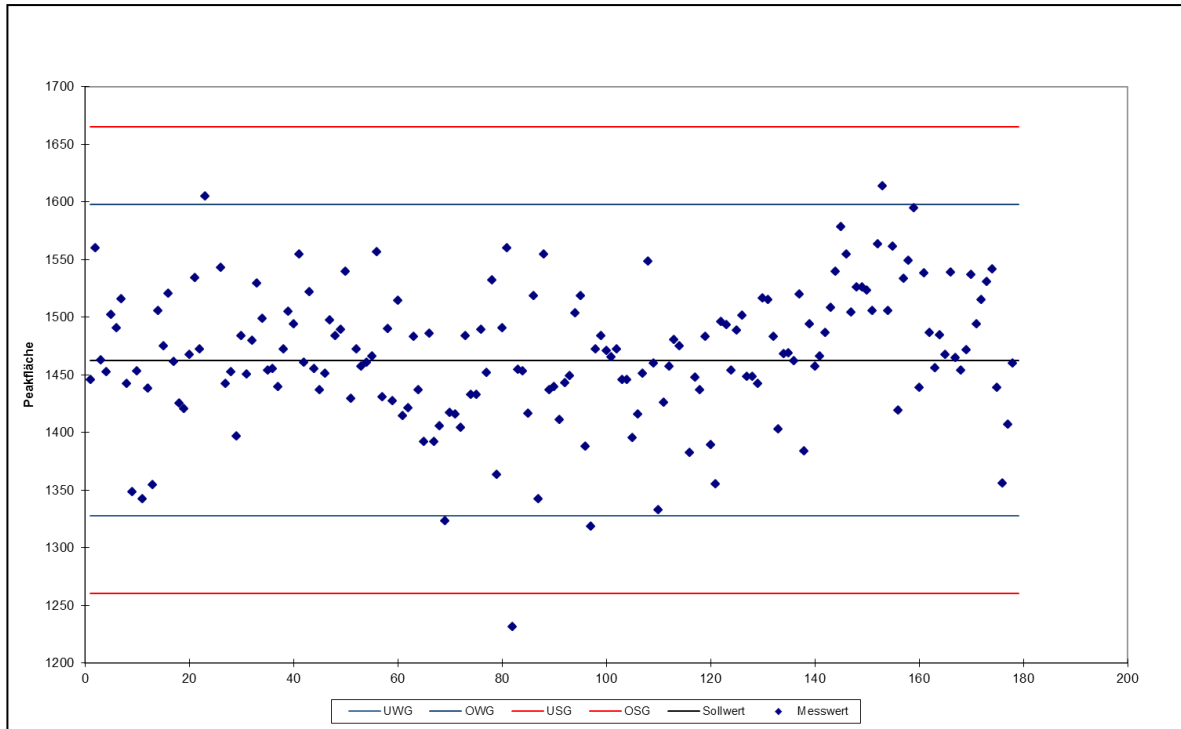


Abb. 4-19a: Aufgetragen sind 180 Messwerte des SSTs eines Kooperationspartners. Der Verlauf zeigt eine normale Streuung und es ist keinerlei Drift über den gesamten Zeitraum (5 Jahre) zu erkennen. In diesem Beispiel liegen die Warngrenzen bei dem 2-fachen der Standardabweichung, während bei dem 3-fachen auf jeden Fall in den Prozess eingegriffen werden muss.

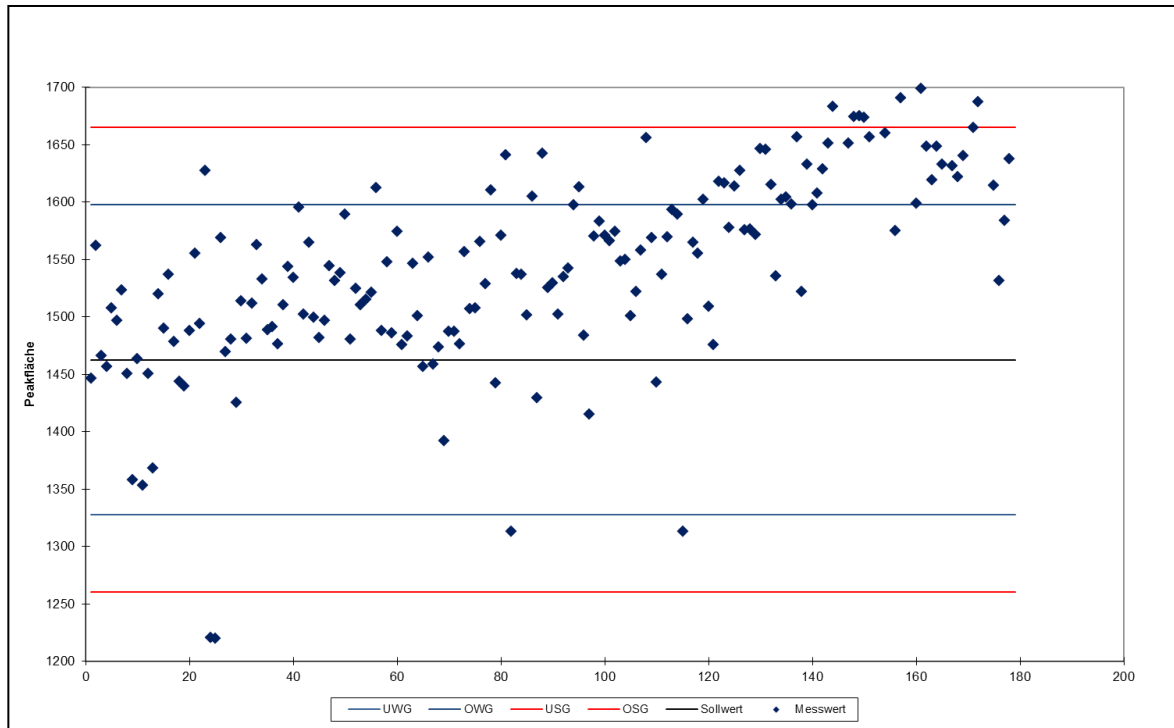


Abb. 4-19b: In diesem Fall wird die natürliche Streuung von einem deutlichen Trend überlagert. Bereits früh lässt sich erkennen, dass mit dem Gerät etwas nicht in Ordnung sein kann.

Die beiden Beispiele zeigen, dass bei der kontinuierlichen PQ mit einfachen Mitteln die Darstellung einer Leistungsentwicklung eines Gerätes möglich ist, die Fehlfunktionen und Abweichungen von der Norm schnell erkennen lässt.

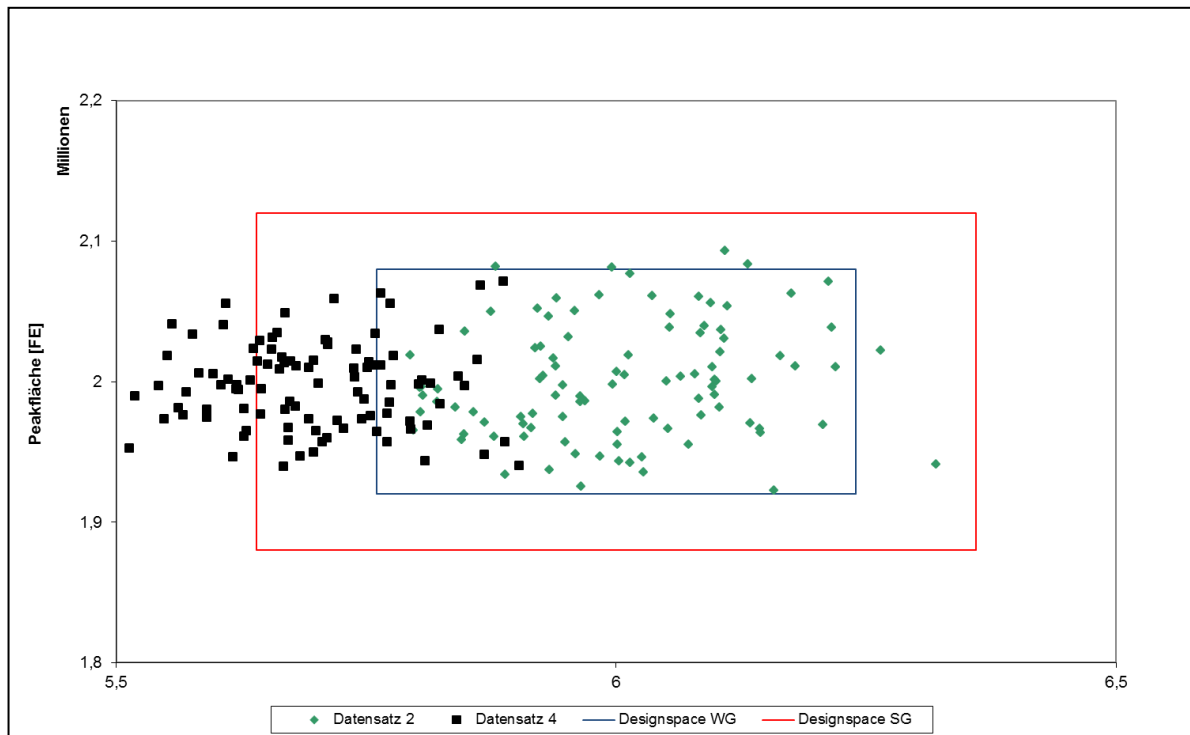


Abb. 4-20: AUC und t_R werden in dieser Karte simultan überwacht. Datensatz 2 zeigt in beiden Dimensionen normale Streuung, während Datensatz 4 zwar unauffällige Peakflächen besitzt aber dafür die Retentionszeiten abwandern.

Um Peakflächen und Retentionszeiten simultan überwachen zu können, wäre der Einsatz einer zweidimensionalen Regelkarte [Abb. 4-20.] denkbar. In Anlehnung an den von der ICH in der Guideline Q8 vorgestellten Design Space [93], könnten hier Flächen anstatt Linien als Warn- bzw. Stoppgrenzen dienen. Der Einsatz von Regelkarten in der kontinuierlichen PQ ist allerdings noch lange nicht etabliert, weshalb die Beispiele auch nur als Denkanstoß für weitere Arbeiten dienen sollen.

4.5. Zusammenfassung

Die Gerätequalifizierung oder, nomenklatorisch richtiger, die Qualifizierung Analytischer Instrumente ist ein essentieller Bestandteil zur Sicherstellung von hoher Datenqualität in der instrumentellen Pharmazeutischen Analytik. Gegenwärtig wird ein diskontinuierlicher Qualifizierungsansatz verfolgt, der auf periodischen Testungen basiert. Es ist aber gerade diese Vorgehensweise, die negativen Einfluss auf die Datenqualität und Wirtschaftlichkeit haben kann. Deswegen wurde in der vorliegenden Arbeit das neue und innovative Konzept der kontinuierlichen PQ als Möglichkeit für eine durchgehende Geräteüberwachung vorgestellt.

Aus Gründen konsistenter Nomenklatur sollte im Englischen die Bezeichnung „*Continuous PQ*“ anstatt „*Ongoing PQ*“ verwendet werden, da letztere in der Literatur [67] eine andere Herangehensweise beschreibt.

4.5.1. OQ + PQ + SST = Das Beste aus drei Welten

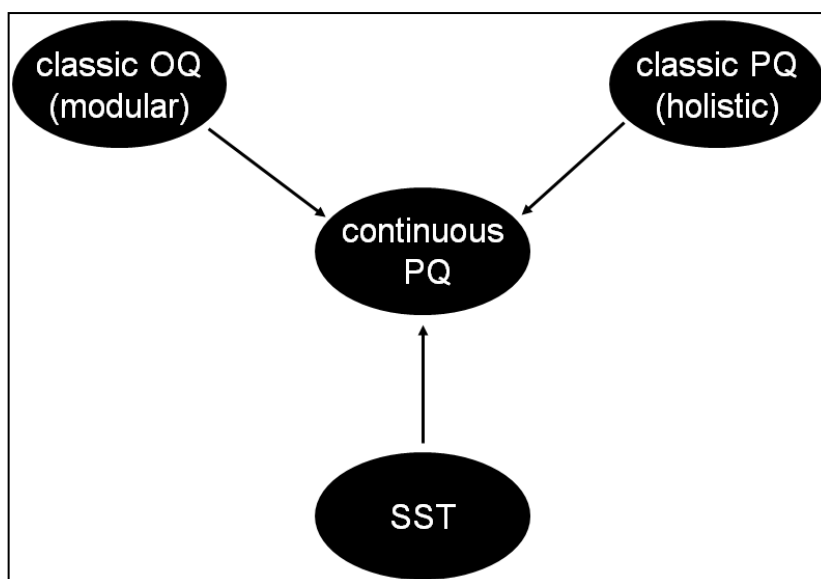


Abb. 4-21: Werden die Parameter der klassischen OQ und PQ zusammengefasst und holistisch während eines erweiterten SSTs überprüft, so entspricht das dem Konzept der kontinuierlichen PQ.

Abbildung 4-21. zeigt die wesentlichen Bausteine der kontinuierlichen PQ. Die als essenziell für eine gründliche Qualifizierung bewerteten Parameter der klassischen OQ und PQ [Tab. 4-1. Und 4-2.], wurden in einer gemeinsamen Tabelle [Tab 4.4.] zusammengeführt. Es wurde gezeigt, dass all diese qualifizierungsrelevanten Parameter auf der holistischen Ebene überprüft werden können. Des Weiteren wurde demonstriert, dass für diese Überprüfung keine Modifikation des Gerätes, wie etwa eine spezielle Säule oder extra mobile Phase, nötig sind und, dass die komplette Qualifizierung während eines (leicht erweiterten) Systemeignungstests stattfinden kann.

Die kontinuierliche PQ ist also ein neues Konzept, welches aber auf Altbewährtes aufbaut und die kombinierten Vorteile der klassischen OQ, PQ und des SST nutzt.

4.5.2. Möglichkeiten und Grenzen der kontinuierlichen PQ

Der entscheidende Vorteil dieses Konzeptes ist die Kontinuität der Geräteüberwachung durch permanente Gewinnung von Eignungsdaten. Auf diese Weise wird die Wahrscheinlichkeit eines plötzlichen Versagens eines Gerätes erheblich gemindert und, was noch viel wichtiger ist, die Reevaluierung von Daten nach einem Nichtbestehen der klassische PQ ganz verhindert. Damit kann die kontinuierliche PQ einen bedeutenden Beitrag zur Wirtschaftlichkeit und Datenqualität in der Pharmazeutischen Analytik liefern.

Als Nachteil kann der gesteigerte Aufwand bei der Durchführung im Vergleich zu einem heutigen SST gesehen werden. In der Tat lassen sich nicht alle Parameter während eines Laufes bestimmen. Die Linearität des Injektionsvolumens / der Detektorantwort benötigt eine Serie von mehreren Injektionen. Das Detektorrauschen und die Drift müssen über einen längeren Zeitraum gemessen werden. Beides ist im SST so nicht vorgesehen, bedeutet also Mehrarbeit. Diese würde jedoch nicht mehr als eine Zeitstunde in Anspruch nehmen und damit durchaus den Mehraufwand gegenüber den genannten Vorteilen rechtfertigen. Trotzdem kann im Einzelfall nach einer Risikobewertung [94] auf die Extraprüfungen verzichtet werden, wenn diese Parameter zumindest in Abständen der klassischen PQ überprüft werden.

Ferner sind leider nicht alle Methoden bzw. ihre SSTs für den Einsatz in der kontinuierlichen PQ geeignet.

4.5.2.1. Was tun, wenn ein SST für die kontinuierliche PQ ungeeignet ist?

Diese Frage kann jeder anhand von den folgenden Beispielszenarien für sich selbst beantworten.

Szenario 1:

Mehrere Methoden werden auf einem Gerät abwechselnd genutzt. Es müssen gar nicht alle einen geeigneten SST aufweisen. Es reicht, wenn der SST zumindest einer Methode genutzt werden kann. So wird jedes Mal, wenn diese Methode gefahren wird, das Gerät qualifiziert.

Szenario 2:

Das Gerät wird regelmäßig für nur eine Methode genutzt. Der SST dieser Methode kann aber nicht alle relevanten Informationen liefern. In diesem Fall muss auf die klassischen Prüfmethode für diese Parameter zurückgegriffen werden.

Zum Beispiel kann die Wellenlängenrichtigkeit nicht überprüft werden, wenn ein Analyt mit undefinierten Absorptionsmaxima vermessen wird. Es muss also das Holmiumoxid oder ein anderer bewährter Standard verwendet werden.

Szenario 3:

Es wird nur eine Methode genutzt, die aber komplett ungeeignet für die kontinuierliche PQ ist. In einem solchen Fall (z.B. komplexe biologische Vielstoffgemische) muss leider die klassische PQ weiter durchgeführt werden.

4.5.2.2. Implementierung im Laboralltag

Die an diesem Projekt beteiligten Arbeitsgruppen (DPhG – Fachgruppe für Pharmazeutische Analytik und die Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik) haben die folgende Vorgehensweise befürwortet:

1. Überprüfen Sie den SST Ihrer Methode. Sollten mehrere Methoden auf einem Gerät laufen, entscheiden Sie sich für die Einfachste(n). Stellen Sie sicher, dass die für den SST gut definierten Standardsubstanzen genutzt werden.
2. Suchen Sie nach einem gut getrennten Peak (Es sollte mindestens einer existieren, da dies normalerweise in einem SST gefordert wird[42, 46]).

3. Erstellen und validieren Sie z.B. eine Exceltabelle, die die RSD%s von Peakflächen und Retentionszeiten des gewählten Peaks automatisch berechnet.
4. Starten Sie ihre Analysenserie, die wie folgt strukturiert sein kann:
 - a. 1 x Leerinjektion (Bestimmung von Detektorrauschen und Drift (1h))
 - b. $3 \leq n \leq 6$ x Standard [42] (Bestimmung aller AUC und t_R abhängigen Parameter)
 - c. 1 x Verunreinigung (nur wenn die SOP eine Reinheitsprüfung vorsieht → Die Toleranzen sind methoden- bzw. substanzspezifisch)
 - d. 1 x Leerinjektion (Bestimmung von Detektorrauschen und Drift (1h), wenn nicht schon unter a. bestimmt)
 - e. 5-10 x Probe (eigentliche Analyse)
 - f. 1 x Standard (Bestimmung der AUC und t_R Drift)
5. Die AUC- und t_R -abhängigen Parameter werden, da sie in der validierten Tabelle gesammelt werden, automatisch nach jedem Lauf ausgewertet. Es wird der Einsatz einer Regelkarte empfohlen, da sich auf diese Weise im Sinne eines Life Cycle Managements die Leistungsentwicklung eines Gerätes schnell nachvollziehen lässt.
6. Die nicht von AUC und t_R abhängigen Parameter können mit etwas Mehraufwand während des SST überprüft werden. Eine monatliche bis maximal halbjährliche (wie in der klassischen PQ) Prüfung dieser Parameter scheint nach einer Risikoanalyse ein möglicher Kompromiss zwischen einer kontinuierlichen und einer wirtschaftlichen Prüfung zu sein.

5. Quantitative Größenausschlusschromatographie

5.1. Grundlagen der Größenausschlusschromatographie

Die Größenausschlusschromatographie (engl. Size Exclusion Chromatography = SEC) unterscheidet sich prinzipiell von der bereits vorgestellten Adsorptions- und Verteilungschromatographie, da hier im Idealfall die Analytmoleküle keine Wechselwirkungen mit der stationären Phase eingehen. Der Trennmechanismus beruht, wie der Name es sagt, auf dem Ausschluss von verschiedenen Größen. Das heißt, dass die Analytmoleküle ausschließlich aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe, oder genauer gesagt aufgrund ihres unterschiedlichen hydrodynamischen Radius (r_H) und ihrer Form getrennt werden [40]. Dabei erfolgt die Trennung nach dem Prinzip eines inversen Siebes, so dass große Moleküle früher als kleine eluieren [Abb. 5-1.]. Geeignet ist diese Methode vor allem für Makromoleküle ($\geq 1\text{kDa}$).

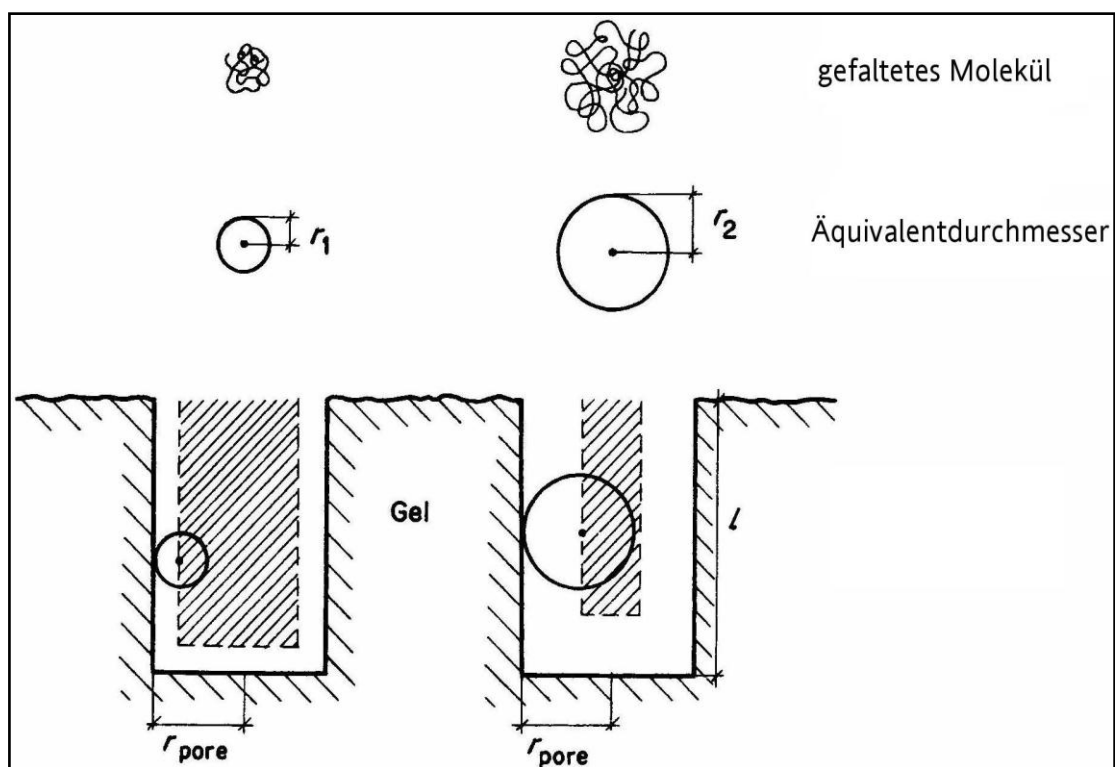


Abb. 5-1.: Die schraffierte Fläche zeigt das für ein Molekül zugängliche Porenvolumen. Die Möglichkeit für das Molekül mit r_1 in die Pore zu gelangen ist also besser als für r_2 . (aus Veronika Meyers Handbuch der HPLC)

Unter der Annahme, dass größere Moleküle gegenüber kleineren auch eine größere Masse besitzen, wird die SEC klassischerweise zur Bestimmung von Molmassen und

Molmassenverteilungen eingesetzt. Da allerdings nicht immer ein direkter Zusammenhang zwischen Größe und Masse besteht, muss auf jeden Fall vor einer Messung eine Kalibrierung mit Makromolekülen von ähnlichem Aufbau und mit ähnlichen Eigenschaften durchgeführt werden [95]. Natürlich kann nicht jedes Trennmedium alle beliebigen Größen trennen. Es werden von den Herstellern immer Trennbereiche für bestimmte Medien angegeben, so dass ein für die Problemstellung geeignetes ausgesucht werden kann [Abb. 5-2.]. Alle Moleküle, die größer sind als die Obergrenze des Trennbereiches, werden nicht getrennt sondern eluieren zeitgleich, da sie zu groß für die Poren sind und einfach an dem Trennmedium vorbeifließen. Auf der anderen Seite bewegen sich die Moleküle, die kleiner als die Untergrenze sind, mit der mobilen Phase in jede noch so kleine Pore und eluieren somit alle zeitgleich am Ende des Chromatogramms [Abb. 5-3a+b.].

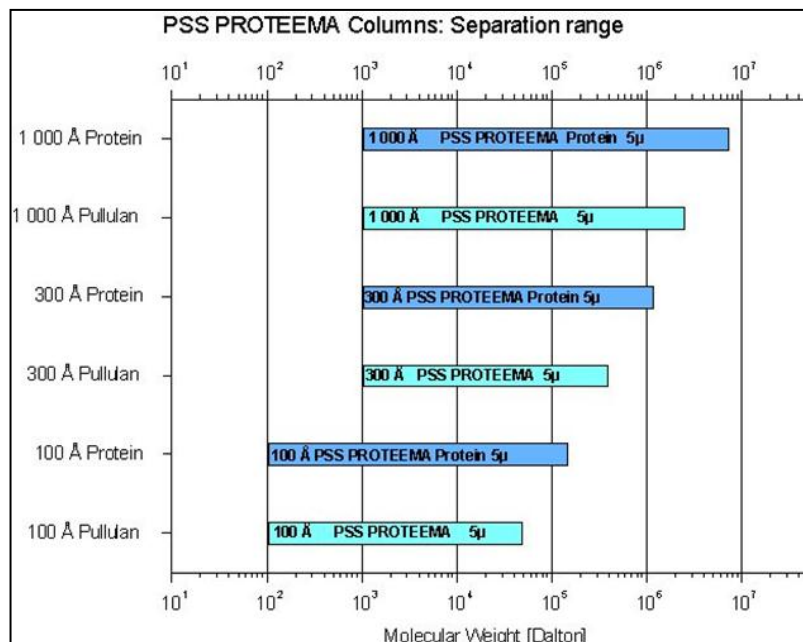


Abb. 5-2.: Verschiedene von der Firma Polymer PSS angebotene Trennbereiche für Proteine. Die Porengröße ist in Å angegeben. (www.polymer.de)

Das Trennmedium besteht je nach verwendeter mobiler Phase aus unterschiedlichen porösen Materialien. Werden organische Lösemittel als Eluent genutzt, spricht man von Gelpermeationschromatographie (GPC) [30] und es dienen z.B. Copolymere aus Polyester, modifiziertem Styrol-Divinylbenzol oder Kieselgel als stationäre Phase [96]. Bei Einsatz von wässrigen Lösungsmitteln ist der Begriff Gelfiltration (GFC) geläufig [30] und es werden z.B. quervernetzte Dextrane, Polyhydroxymethylacrylat oder modifiziertes Kieselgel als stationäre Phase verwendet [96]. Heutzutage wird sowohl die GPC als auch GFC vorwiegend in Form einer Hochleistungstrennung in

einer Säule an einer HPLC-Anlage durchgeführt. Die Bezeichnung dafür lautet analog zu der klassischen LC: HP-SEC oder SE-HPLC. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit ist mit SEC immer die HP-SEC gemeint.

5.1.1. Chromatographische Parameter in der SEC

So wie die Technik selbst, unterscheiden sich auch einige der chromatographischen Parameter von denen in der RP-HPLC [Abb. 5-3a.]. So wird in der SEC nicht von Retentionszeiten (t_R), sondern von Elutionsvolumina (V_e) gesprochen. Das Chromatogramm heißt hier Elugramm. Da die mobile Phase die kleinsten Moleküle besitzt, wird die Totzeit bzw. das Totvolumen (V_t) nicht von dem ersten, sondern von dem zuletzt eluierenden Peak abgeleitet. Dadurch ist die maximale Analysenzeit, nämlich V_t für jede Säule fest vorgegeben und kann nicht verändert werden.

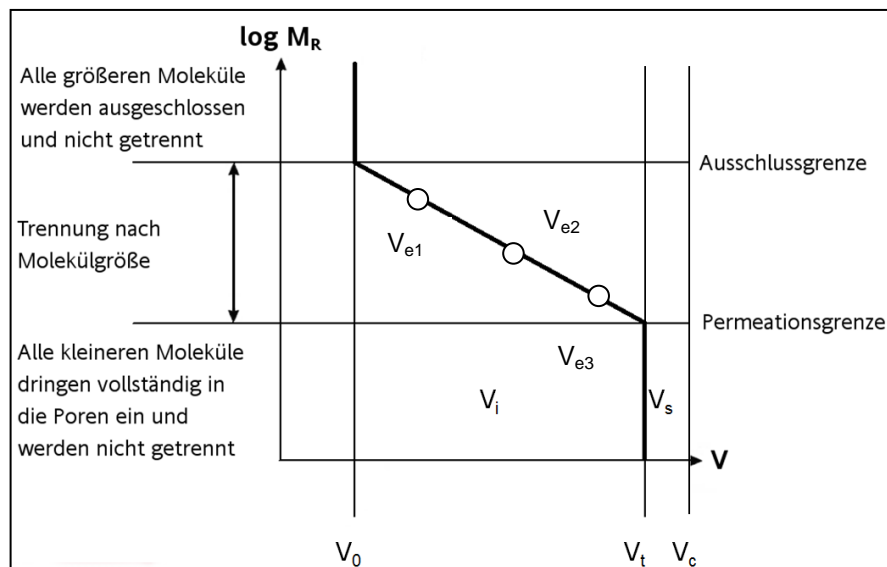


Abb. 5-3a.: eine theoretische Kalibriergerade bei der SEC. Es wird der dekadische Logarithmus der Molmasse gegen das Elutionsvolumen aufgetragen. Die Moleküle, die größer als die Ausschlussgrenze, bzw. kleiner als die Permeationsgrenze sind, werden nicht getrennt. (aus Veronika Meyers Handbuch der HPLC)

V_c steht in Abb. 5-3a. für das absolute Volumen der leeren Säule ($= \pi \cdot r^2 \cdot h$). Das Totvolumen V_t ist das maximal zugängliche Volumen, während $V_s (= V_c - V_t)$ das Volumen des nichtzugänglichen Festkörpers der stationären Phase angibt. V_0 ist das Zwischenkornvolumen und $V_i (= V_t - V_0)$ das gesamte Porenvolumen, in dem die Trennung nach Masse stattfindet.

Einen weiteren Unterschied findet man bei dem Kapazitätsfaktor k_D (vgl. Gl. 3). Er wird zwar auf ähnliche Weise (Gl. 27) berechnet, er ist aber im Gegensatz zu der

HPLC nach oben durch den in Gl. 28 dargestellten Zusammenhang auf 1 beschränkt.

$$k_d = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0} = \frac{V_e - V_0}{V_i} \quad (\text{Gl. 27})$$

$$k_{d(\max)} = \frac{V_t - V_0}{V_t - V_0} = \frac{V_i}{V_i} = 1 \quad (\text{Gl. 28})$$

In der Realität entstehen bei der Kalibrierung keine optimalen Geraden, sondern vielmehr Trennbereichskurven [Abb. 5-3b], die sich aus mehreren quasilinearen Teilen zusammensetzen. Die Säule mit dem Porendurchmesser von 300 Å und den Dimensionen 300 · 8 mm wurde für die in dieser Arbeit vorgestellten SEC-Versuche benutzt.

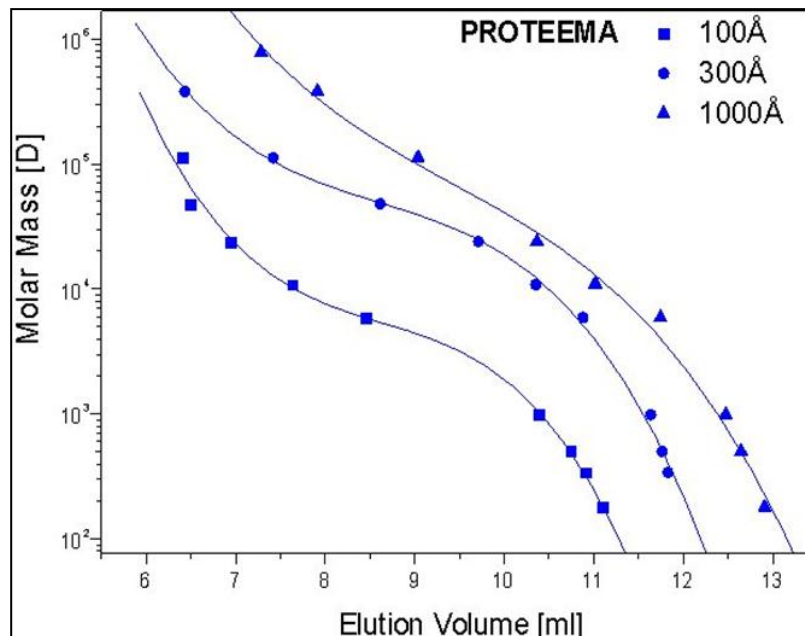


Abb. 5-3b.: drei reale Kalibrierkurven bei der SEC. Aus dem maximalen Elutionsvolumen kann die maximale Analysendauer abgeleitet werden. Wird ein Volumenfluss von 1,000 ml/min verwendet, so entspricht das Volumen der Analysenzeit. (www.polymer.de)

Die Peaks zweier Substanzen lassen sich erst ab einer Massendifferenz von etwa 10% unterscheiden [30], allerdings müssen sich wegen der logarithmischen Beziehung die Massen bisweilen um eine Zehnerpotenz oder mehr unterscheiden um basisliniengetrennt zu eluieren. Durch diese klar definierten Grenzen ist die Peakkapazität (Gl. 7) sehr eingeschränkt, sodass innerhalb des Arbeitsbereichs nur wenige Peaks mit deutlichen Massenunterschieden basisliniengetrennt eluieren können.

5.2. Einsatz der SEC in der Pharmazeutischen Analytik

Seit dem Ende der 1950 Jahre als Porath und Flodin mit den quervernetzten Dextranen (Sephadex®) die Grundlage für die GFC schufen [97], ist diese Technik in kaum veränderter Form heutzutage immer noch als ein wichtiges Werkzeug bei der Charakterisierung von Biopolymeren im Einsatz. Für die HP-SEC sind die Dextran-basierten stationären Phasen wegen ihrer Quelleigenschaften jedoch nicht geeignet, weshalb auch modifiziertes Kieselgel, wegen seiner mechanischen Stabilität und definierten Porengröße, bevorzugt eingesetzt wird.

Die GFC wird heute hauptsächlich im biotechnologischen Bereich als Teil des Downstream Processings, also der Aufreinigung von Fermentationsprodukten, genutzt. In der Pharmazeutischen Analytik wird die Technik für die Aufreinigung und Isolation [40] sowie für die spätere Reinheitsprüfung von Biopharmazeutika wie z.B. Insulin [98] angewandt. Ferner nutzt das Ph. Eur. die GFC zur Identifizierung von Proteinaggregaten, wie z.B. Dimeren bei der Testung auf verwandte Substanzen in den Monographien von Somatotropin [13] und Erythropoetin [99]. Obwohl die GFC in ihrem eigentlichen Einsatzgebiet, der Molmassenbestimmung und der Bestimmung der Molekülgrößenverteilung, immer stärker von der Massenspektrometrie bedrängt wird [40], ist sie immer noch Methode der Wahl des Arzneibuches für diesen Zweck. Das kann durchaus mit der fortlaufenden Optimierung und Effizienzsteigerung [96, 100], sowie dem extremen Kostenvorteil der GFC gegenüber der MS gerechtfertigt werden. Auch die einfachere Auswertung der Daten ist von großem Vorteil.

5.2.1. Auswahl geeigneter chromatographischer Bedingungen

Trotz der relativ einfachen Durchführung der eigentlichen GFC-Analyse sind im Vorfeld einige Faktoren zu berücksichtigen, die ansonsten die erhaltenen Daten unbrauchbar machen können. Für alle eingangs genannten Anwendungsgebiete müssen unbedingt ideale SEC Bedingungen herrschen. Das heißt, dass die zu untersuchenden Biopolymere rein physikalisch aufgrund ihrer Molmasse (oder genauer, ihres hydrodynamischen Radius = Größe) getrennt werden sollen, ohne mit dem Packmaterial der Säule auf andere Weise zu interagieren. Dies zu erreichen ist jedoch recht schwierig. Wie bereits erwähnt wird vorwiegend Kieselgel als stationäre Phase genutzt. Wegen seiner reaktiven Silanolgruppen muss es chemisch so modifiziert werden, dass es mit den Proteinen nicht interagiert. Diese Modifizierung verhindert die Interaktionen aber leider nicht vollständig. Insbesondere treten

weiterhin elektrostatische und hydrophobe Protein-Protein und Protein-Oberflächen-Wechselwirkungen auf. Um diese zu minimieren muss bei der Auswahl der mobilen Phase, welche bei der GFC in der Regel aus einem wässrigen Puffer besteht, besonders auf den pH -Wert und die Ionenstärke geachtet werden. Mit sinkendem pH werden die elektrostatischen Wechselwirkungen zwar schwächer, aber man sollte bedenken, dass die Stabilität der Proteine ebenfalls vom pH beeinflusst wird. Des Weiteren kann durch Steigerung des Salzgehaltes die Ionenstärke erhöht und damit ebenfalls die elektrostatischen Wechselwirkungen gesenkt werden. Allerdings werden gleichzeitig, durch den „Aussalz“-Effekt die hydrophoben Wechselwirkungen verstärkt. Aus diesem Grund wird sowohl in der verfügbaren Literatur, als auch von den führenden GFC-Säulen-Herstellern ein optimaler Arbeitsbereich für Proteine mit einem pH -Wert von 5 – 8 und einer Ionenstärke von 0,05 – 0,3 M angegeben [40, 101].

Proteine besitzen amphoteren Charakter und liegen deshalb bei unterschiedlichen pH -Werten unterschiedlich geladen vor. Nur bei einem bestimmten pH -Wert, dem sogenannten Isoelektrischen Punkt (pI , IEP), liegt ein Protein ladungsneutral vor [24 und dort zitierte Literaturquellen]. Dieser Punkt ist von der Anzahl der Aminosäuren und deren Zusammensetzung abhängig und somit charakteristisch für jedes Protein. Hier besitzt ein Protein seine geringste Löslichkeit und zugleich das geringste Bestreben elektrostatische Wechselwirkungen einzugehen. Somit wäre die Einstellung der mobilen Phase auf einen pH -Wert in der Nähe des pI wünschenswert. Leider ist dies bei einem Gemisch verschiedener Proteine nur selten möglich, da diese sich teilweise sehr stark in ihren pI s unterscheiden. Auch finden sich bei weitem nicht alle pI s in dem vorgeschlagenen Fenster von $pH = 5 – 8$. Somit muss davon ausgegangen werden, dass bei einem Proteingemisch nicht für jedes der Proteine eine ideale SEC gewährleistet werden kann.

5.2.1.1. Modifizierung der Ionenstärke

Für die Einstellung der Ionenstärke wird für gewöhnlich NaCl genutzt. Die Berechnung erfolgt nach Gleichung 29 [102].

$$I_C = \frac{1}{2} \cdot \sum_i c_i \cdot z_i^2 \quad (\text{Gl. 29})$$

I_C = Ionenstärke der Lösung bezogen auf die Stoffmengenkonzentration

c_i = Stoffmengenkonzentration der Ionensorte i in mol/L

z_i = Ladungszahl der Ionensorte i

Natriumchlorid hat den Vorteil, dass es sehr günstig in der Beschaffung und nicht toxisch ist. Außerdem ist sein Beitrag zum pH-Wert der mobilen Phase vernachlässigbar. Im Jahr 2005 stellten Ejima et al. in ihrer Arbeit den Einsatz von Arginin anstelle von NaCl als Ionenzusatz vor [103]. Sie zeigten in dieser Arbeit, welche überdies auch zum Patent angemeldet wurde [104], dass Arginin die unerwünschten nicht-spezifischen Wechselwirkungen zwischen den dort vorgestellten Proteinen und dem GFC-Material besser unterdrücken kann als das NaCl. Ferner zeigt Arginin keinen signifikanten „Aussalz“-Effekt, weswegen es seine Stärken auch bei höheren Konzentrationen ausspielen kann. Laut Ejima et al. hat das Arginin nicht nur keine nachteiligen Effekte auf Proteine, sondern kann diese sogar bei ihrer Solubilisierung aus Einschlussverbindungen sowie bei ihrem Refolding unterstützen und zusätzlich die Aggregation von denaturierten Proteinen verhindern [103, 104].

Zwei Nachteile wurden allerdings nicht thematisiert. Zum einen ist Arginin aufgrund seiner Guanidin-Gruppe stark basisch. Die mobile Phase muss deswegen entsprechend eingestellt und gepuffert werden oder es muss direkt Arginin-HCl eingesetzt werden. In beiden Fällen muss dies für die Gesamtionenstärke berücksichtigt werden. Der zweite und entscheidendere Nachteil ist die Eigenabsorption des Arginins. Anders als NaCl lässt Arginin elektromagnetische Strahlung bis etwa $\lambda = 230 \text{ nm}$ nicht durch. Daraus folgt, dass die Detektionswellenlänge auf das nächst mögliche Absorptionsmaximum der Proteine bei $\lambda = 280 \text{ nm}$ eingestellt werden muss. Bei dieser Wellenlänge absorbieren die Proteine allerdings nur noch schwach [Abb. 5-10.], weshalb kleine Konzentrationen nicht mehr detektiert werden können (siehe Abschnitt 5.3.1.3.).

5.2.2. Molmassenbestimmung am Beispiel eines Polycysteins

Wie bereits erwähnt ist der typische Anwendungsbereich der SEC die Molmassenbestimmung. Die Vorgehensweise soll im Folgenden kurz demonstriert werden.

Es wurden verschiedene neue Synthesewege für Polycystein getestet. Es sollte die Synthese gefunden werden, welche ein Polycystein mit einer Molmasse im Bereich um 5 kDa ergab. Für die Kalibrierung wurden die Proteine Ovalbumin (44 kDa) und Myoglobin (17,5 kDa) gewählt, da ihre Massen im Zielbereich des gesuchten Polycysteins lagen. Das Totvolumen V_t betrug 13,5 ml bei einer Flussrate von 1,0

ml/min. Es wurde mittels Natriumazid bestimmt, weil das NaN_3 wegen seiner geringen Größe und UV-Aktivität besonders gut dafür geeignet ist. Das Elugramm der schließlich gefundenen Synthese ist in Abb. 5-4. dargestellt.

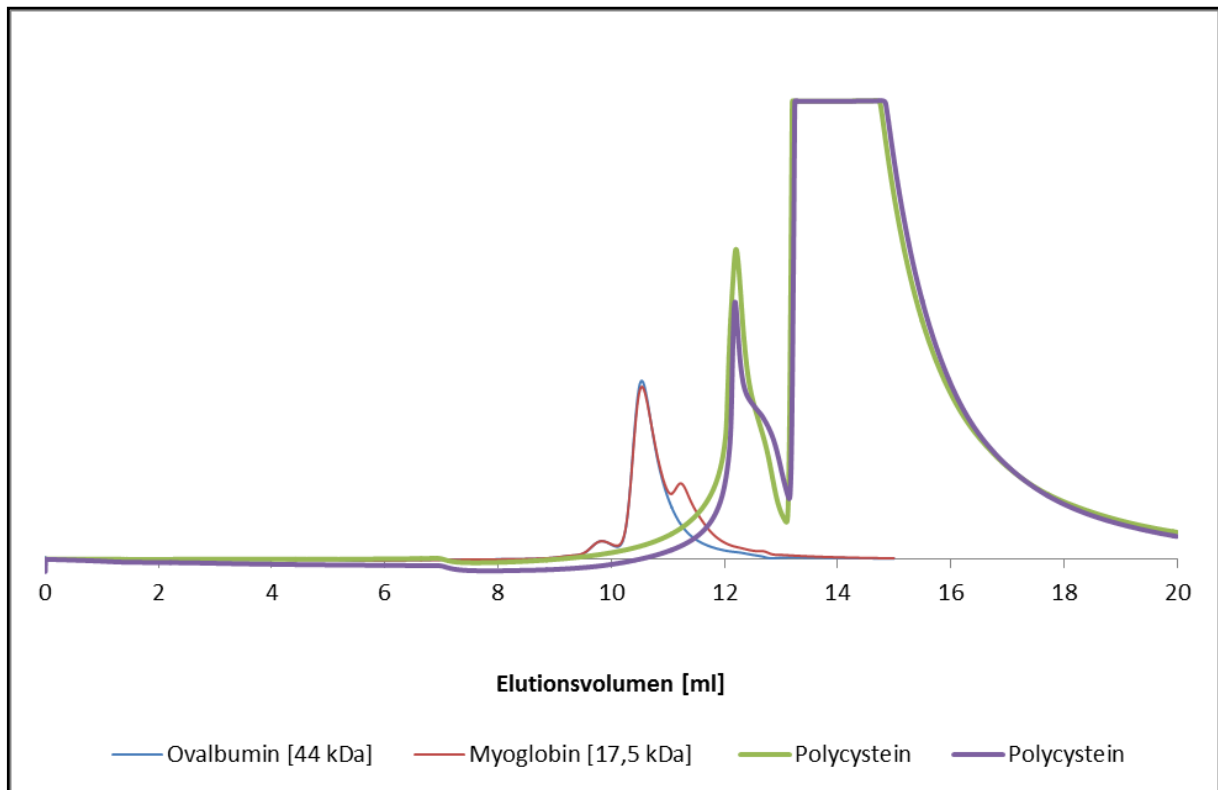


Abb. 5-4.: Zwei repräsentative Elugramme aus zwei Chargen des Polycysteins mit der gesuchten Molmasse. Das Elutionsvolumen V_e beträgt 12,2 ml. Das blaue Elugramm ist das von Ovalbumin, das rote gehört zu Ovalbumin und Myoglobin. Diese Proteine wurden zur Kalibrierung verwendet. Das Totvolumen V_t beträgt 13,5 ml.

Die Polycystein-Proben mussten nicht besonders vorbehandelt werden, da die übriggebliebenen Edukte der Synthese allesamt eine kleinere Masse als 1 kDa besaßen und somit mit dem Totvolumen eluierten, wie aus dem sehr großen letzten Peak in Abb. 5-4. deutlich wird.

Die Kalibriergerade, aus der die Molmasse ermittelt wurde, ist in Abb. 5-5. zu sehen. Auf der Abszisse wurde das Elutionsvolumen der getesteten Polycysteins und auf der logarithmierten Ordinate die dazugehörige mittlere Molmasse von 5 kDa abgelesen. Es konnte also mit der GFC die erfolgreiche Synthese bestätigt werden. Da zudem nur ein einziger Peak eluierte, deutet es darauf hin, dass während der Synthese nur das gesuchte Produkt, ohne zusätzliche (größere) Agglomerate entstanden ist. Somit liefert die GFC hier nicht nur Informationen zur Molmasse, sondern auch zu der Reinheit der zu charakterisierenden Substanz.

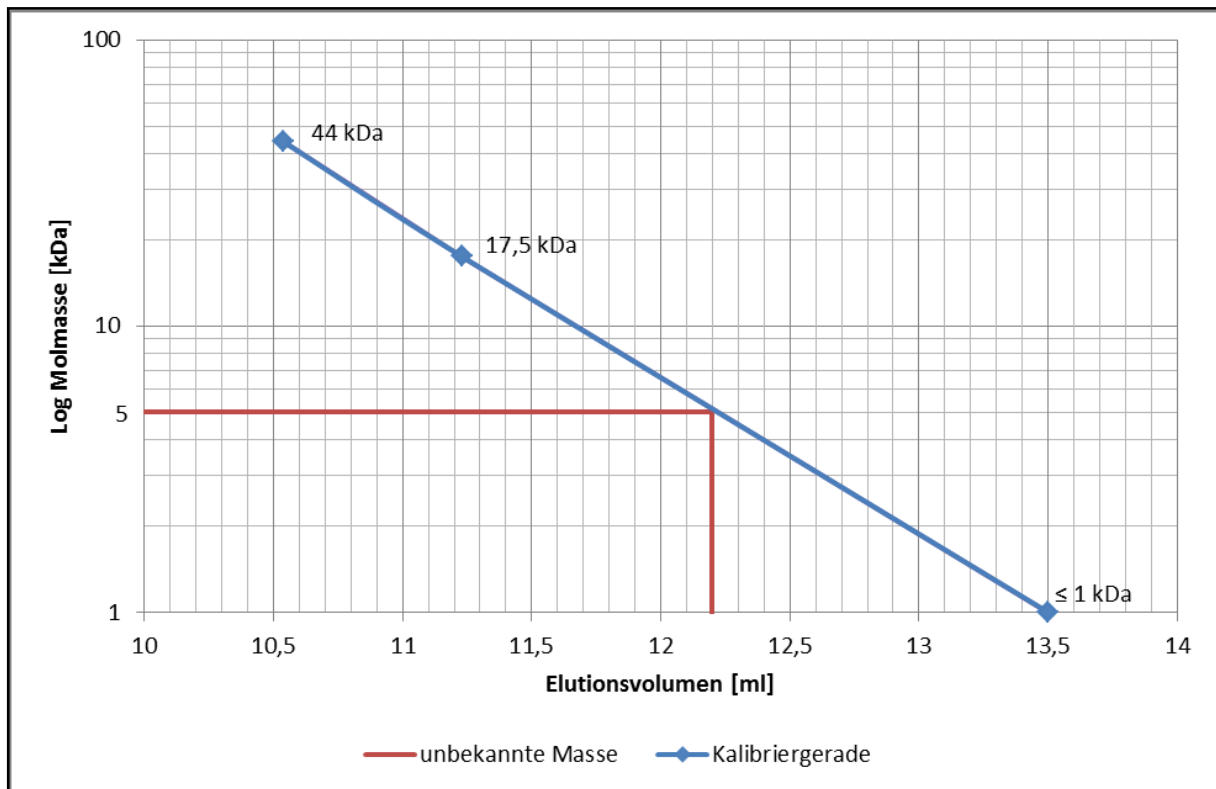


Abb. 5-5.: Auf der Abszisse wird das V_e der untersuchten Substanz, und auf der Ordinate ihre Molmasse abgelesen. Für die Kalibrierung wurden Ovalbumin (44kDa), Myoglobin (17,5 kDa) und NaN_3 (<1 kDa) verwendet.

5.3. Quantitative SEC

Häufig wird vom Europäischen Arzneibuch nur die Bestimmung des Gesamtproteingehaltes gefordert [105]. Hier sind besonders die Bestimmung nach Bradford (LOQ: 1 – 20 $\mu\text{g/ml}$ im Micro Assay), die Biuret-Methode (LOD: 1 – 10 $\mu\text{g/ml}$) und die darauf basierende Lowry-Methode hervorzuheben. Bisweilen wird noch die Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl verwendet, wovon jedoch aufgrund der fehlenden Spezifität dieser Methode (vgl. Melaminskandal in China 2008) [106] abgeraten werden sollte.

Die Suche nach Möglichkeiten einer echten Trennung und Quantifizierung für Proteine hat seit der Einführung der sogenannten Biologicals (proteinbasierter Pharmazeutika) zur Behandlung von immunvermittelten und kanzerösen Erkrankungen [17-19] einen neuen Antrieb bekommen. Neben neuen und kostenintensiven Methoden, wie der Isotopen markierten massenspektrometrischen Bestimmung (iTRAQ) [25], ist vor allem die 2D-Gelelektrophorese für diesen Zweck sehr gut geeignet. Obwohl die Präzision dieser Technik in den letzten Jahren erheblich gesteigert werden konnte (von über 60% RSD auf unter 5% RSD), ist dafür leider auch teures Detektionsequipment, in Form eines NIR-Scanners nötig [24].

Die SEC, insbesondere die GFC wird heute kaum bis gar nicht auf diesem Gebiet genutzt. Das Ph. Eur. gibt in Kapitel 2.2.30 zwar die Möglichkeit zur „Bestimmung der relativen Zusammensetzung“ mittels SEC, setzt diese in Form der GFC aber nur für die Gehaltsbestimmung von Somatropin ein [13]. Die GPC wird für die Gehaltsbestimmung von Diethylenglycolestern der Stearin- und Palmitinsäure [107] eingesetzt. Da wo die SEC für die Gehaltsbestimmung zum Einsatz kommt, wird allerdings nur eine Reinsubstanz quantifiziert. Für die Trennung und anschließende Quantifizierung eines Biopolymergemisches wird sie hingegen nicht genutzt. In der Literatur wird die SEC lediglich als orthogonale Methode zur klassischen HPLC, zur asymmetrischen Fluss Feld-Fluss-Fraktionierung (AFFFF) und zur Lichtstreuung empfohlen, wenn es um Quantifizierung von Proteinen geht [108]. Die vorliegende Arbeit soll deshalb zeigen, dass sowohl die Trennung eines Proteingemisches als auch die anschließende Gehaltsbestimmung der einzelnen Komponenten mit der SEC durchaus möglich und dazu kostengünstig ist.

5.3.1. Präzision in der GFC

Als ersten Schritt für den Eignungsnachweis zur Quantifizierung von Proteinen wurde eine Präzisionsuntersuchung durchgeführt. Es wurde eine SEC-Säule für Proteine einer Größe zwischen 1000 kDa und 1 kDa an einem HPLC Gerät mit UV-Detektion verwendet. Für die Untersuchungen wurde als globuläres Modellprotein das Ovalbumin mit einer Molmasse von 44 kDa verwendet [Abb. 5-6.].

5.3.1.1. Präzision des Elutionsvolumens (V_e)

Für diese Bestimmung wurde mehrere Serien mit je $n = 50$ bzw. 60 durchgeführt. Als mobile Phase wurde der von der Herstellerfirma der Säule für Proteinuntersuchungen vorgeschlagene Phosphatpuffer $pH = 6,6$ (nach Ph. Eur.) + $0,3$ Mol NaCl verwendet. Das Ovalbumin wurde vor jeder Serie frisch abgewogen, in der mobilen Phase gelöst und die Serie wurde gestartet. Die erhaltene Präzision $RSD\%_{V_e}$ war mit $0,13\%$ sehr gut. Eine nähere Untersuchung zeigte aber einen deutlichen Trend zu kleineren Elutionsvolumina hin [Abb. 5-7a.]. Kleinere V_e bedeuten entweder Aggregation der Moleküle oder aber Wechselwirkungen anderer Art. Um dies zu untersuchen wurde die NaCl-Konzentration des Puffers sukzessive in $0,05$ Mol Schritten gesenkt, bis schließlich bei $0,15 - 0,2$ mol/L NaCl kein Trend mehr und eine noch bessere $RSD\%_{V_e}$ von $0,08\%$ erreicht wurden [Abb. 5-7b].

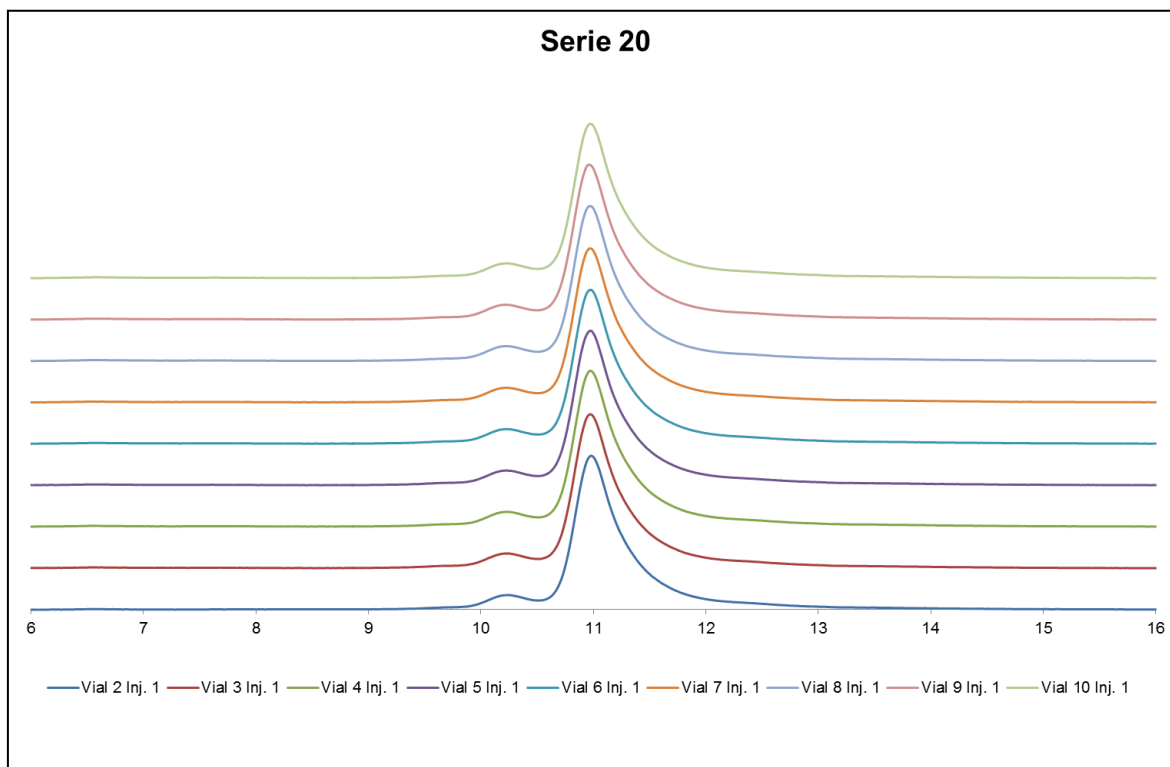


Abb. 5-6.: Die überlagerten Elugramme aus Serie 20. Dargestellt ist jeweils die erste von sechs Injektionen aus 10 Vials. Daten aus Vial 1 waren stark abweichend und wurden nicht verwendet [s. Abschnitt 5.3.1.2.].

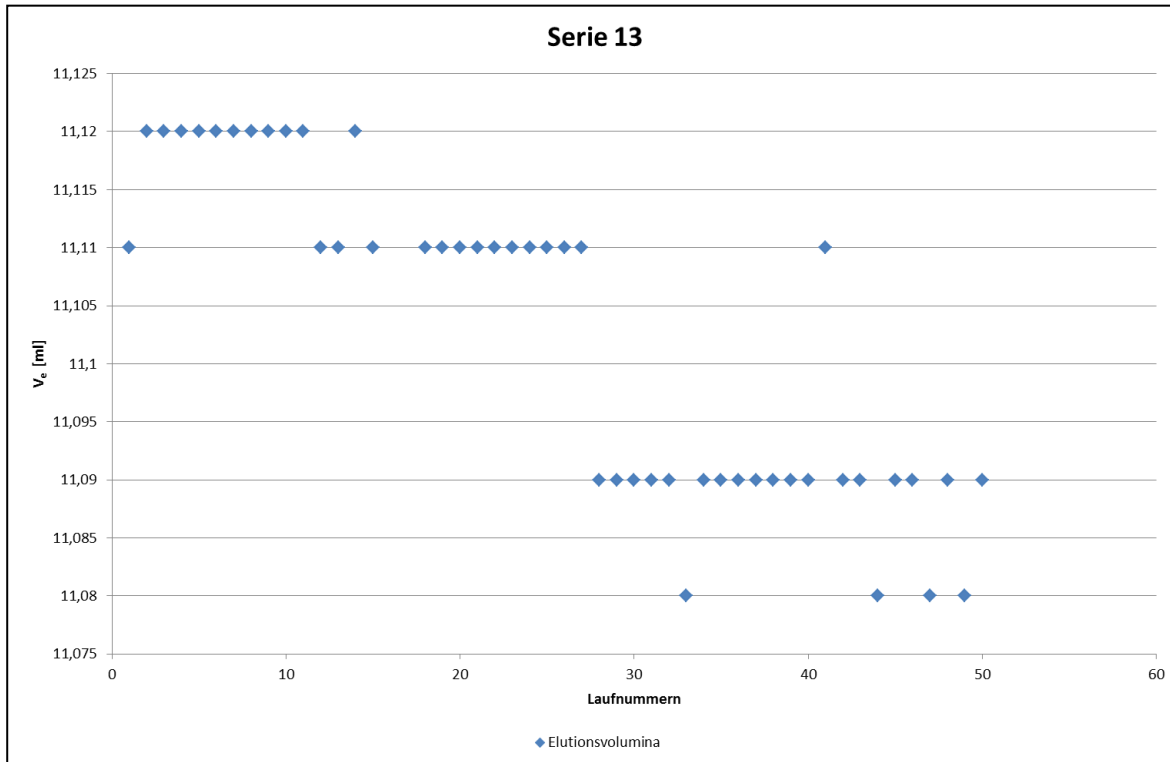


Abb. 5-7a.: Trotz einer sehr guten Präzision ($\text{RSD}\%_{V_e} = 0,13\%$) ist bei dieser Serie ein Trend erkennbar.

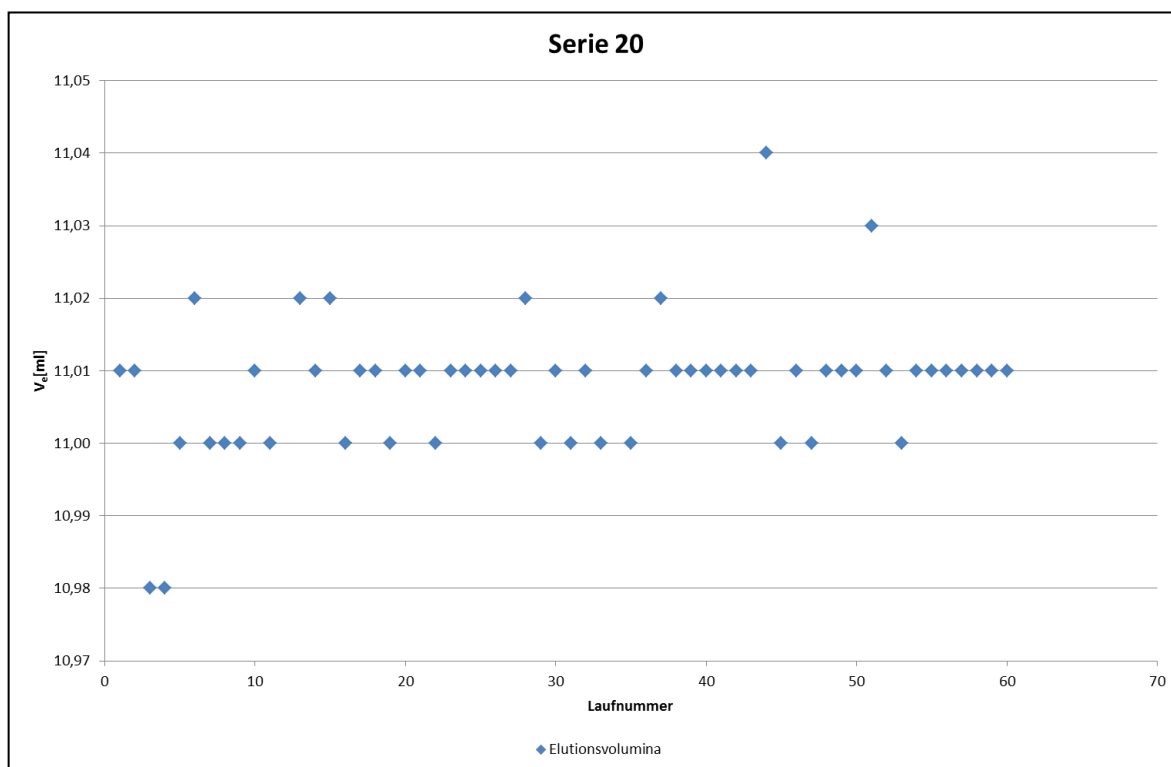


Abb. 5-7b.: Nach einer Reduktion der NaCl Konzentration auf 0,2 mol/L ist der Trend verschwunden und die RSD% sogar noch besser (0,08%).

Hier wurde demonstriert, wie stark die Stabilität der Elutionsvolumina von der Ionenstärke abhängt. Leider ist die für Ovalbumin gefundene NaCl-Konzentration nicht zwingend für alle anderen Proteine optimal. Es zeigt sich erneut, dass es sehr schwer (wenn nicht unmöglich) ist, ideale SEC-Bedingungen für alle Proteine in einem Gemisch zu bieten.

5.3.1.2. Präzision der Peakflächen (AUC)

Hierfür wurden die gleichen Analysenserien, wie oben verwendet. In zwei Serien ($n = 60$) mit 0,3 mol/L NaCl im Puffer wurde ein $RSD\%_{AUC}$ von lediglich 5,09 und 5,58 [Abb. 5-8a.] bestimmt, was für eine Quantifizierung im Sinne der Qualitätskontrolle unzureichend ist. Mit Reduzierung der Ionenstärke verbesserte sich auch hier die Präzision. Das beste Ergebnis ($RSD\%_{AUC} = 1,16$) wurde mit einem völlig NaCl freien Phosphatpuffer erreicht [Abb. 5-8b.]. Allerdings gilt auch dies nur für das untersuchte Ovalbumin und nicht zwingend für alle anderen Proteine. Zu beachten ist auch, dass eine derartige Reduktion der Ionenstärke große Auswirkungen auf die idealen SEC-Bedingungen hat und somit auch eine Veränderung der Selektivität nach sich zieht [Abb. 5-9.]. Es muss also für jedes Trennproblem ein individueller Kompromiss zwischen guter Präzision und der Auftrennung der Proteine gefunden werden.

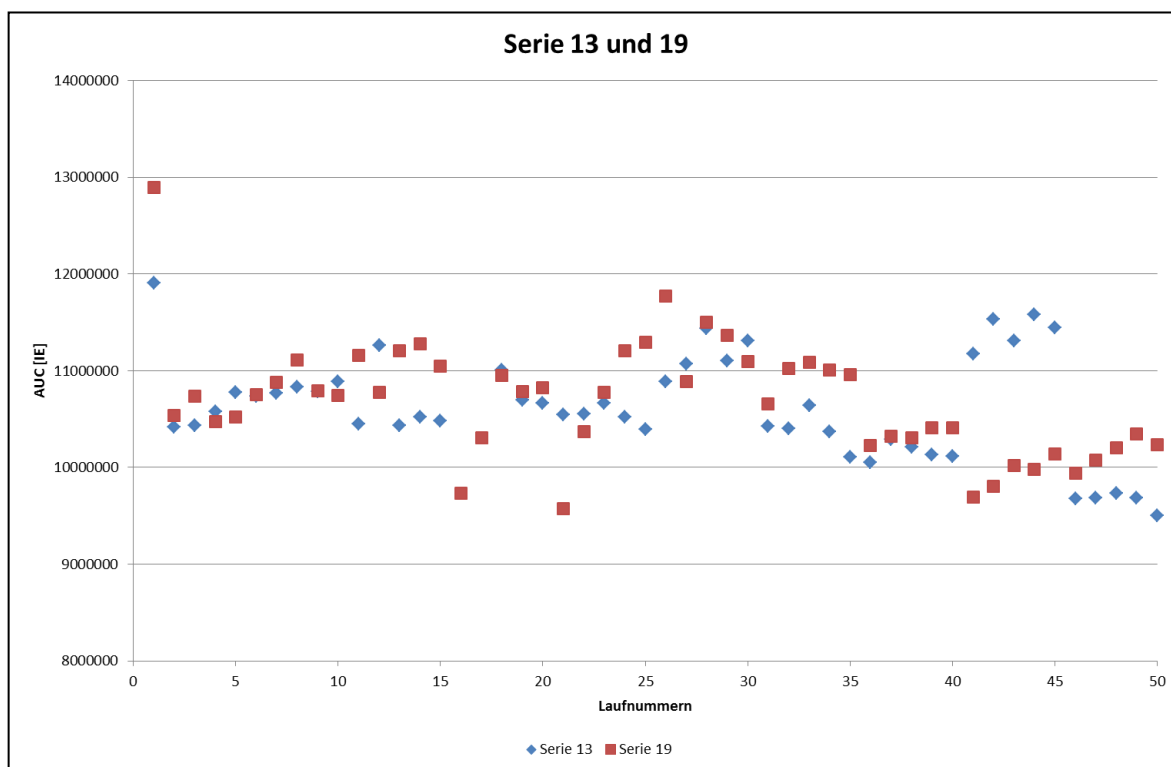


Abb. 5-8a.: Als mobile Phase und Lösungsmittel für das Ovalbumin wurde hier ein Phosphatpuffer $pH = 6,6$ mit 0,3 Mol NaCl-Zusatz verwendet. Die Streuung lag bei beiden Serien über 5%. Auffällig ist die Zunahme der Streuung jeweils zum Ende der Serien hin.

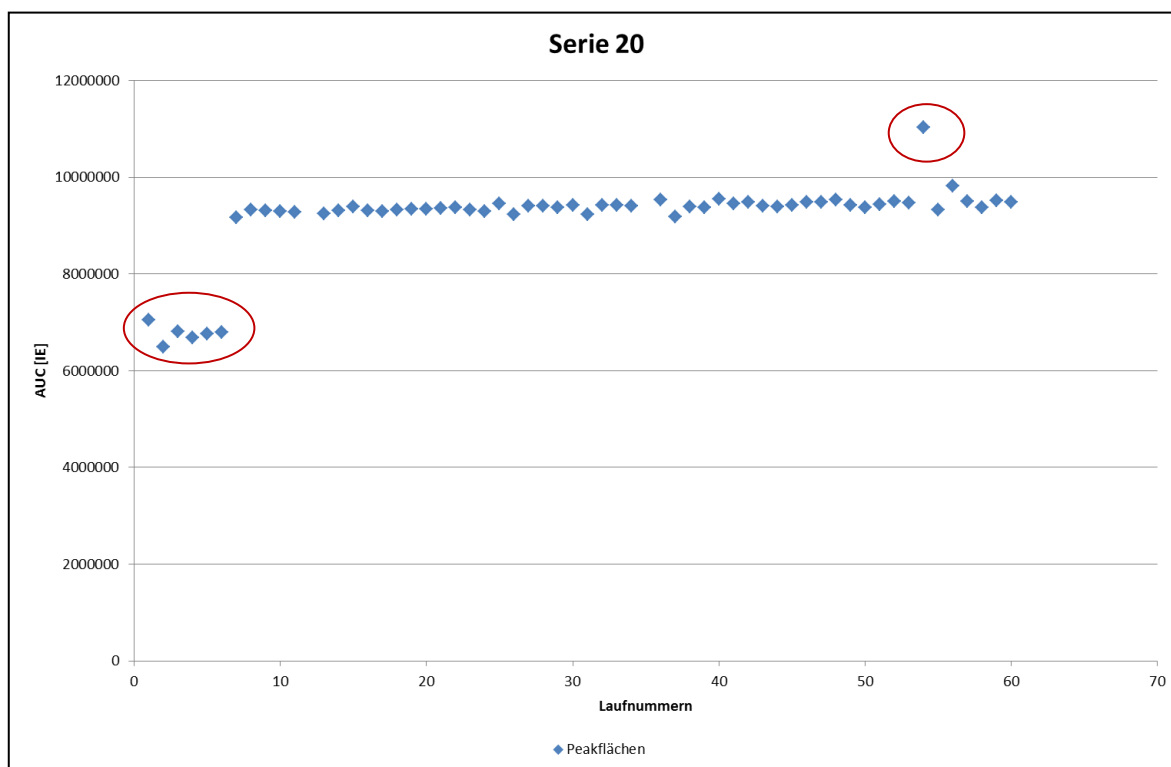


Abb. 5-8b.: In der Serie 20 wurden die 0,3 Mol NaCl im Puffer weggelassen. Die Präzision verbesserte sich auf 1,16% RSD. Die ersten sechs Werte aus Vial 1, sowie die Werte 12, 35 und 54 wurden nicht in die Berechnung einbezogen.

Die ersten sechs Injektionen (Vial 1) in Abbildung 5-8b. lagen alle deutlich unter der erwarteten Peakfläche und wurden nicht in die Präzisionsberechnung einbezogen. Möglicherweise ist dies auf adsorptive Effekte an der Glaswand des Vials zurückzuführen [109]. Es konnte jedoch nicht eindeutig geklärt werden, da nach gründlicher Spülung des Vials mit dem Puffer dieser Effekt nicht wieder beobachtet wurde. Ferner wurden die Läufe 12, 34 und 54 (rot markiert) nicht berücksichtigt. Bei den Erstgenannten tauchte gar kein Peak auf, was auf ein nicht gelungenes Durchstechen des Septums zurückgeführt wurde. Lauf 54 wurde als Ausreißer angesehen.

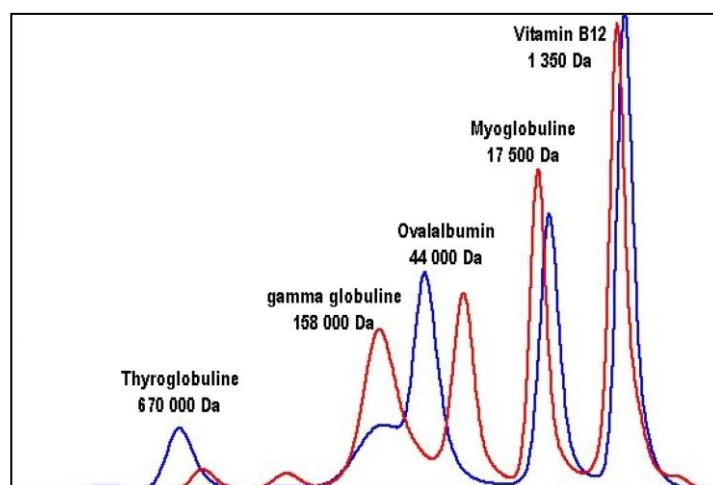


Abb. 5-9.: Das rote Elugramm wurde mit 0,3 Mol NaCl Zusatz erhalten, das blaue ohne. Es wird deutlich, wie stark die Selektivität von der Ionenstärke abhängt. (www.polymer.de)

5.3.1.3. Auswahl der Detektionswellenlänge und ihr Einfluss auf die LOQ

Wie bei allen analytischen Techniken, bei denen UV/VIS zur Detektion genutzt wird, ist auch bei der GFC von Proteinen die Wahl einer geeigneten Detektionswellenlänge sehr wichtig.

Alle Proteine weisen sehr ähnliche UV-Spektren auf [Abb. 5-10.], da sie alle aus denselben proteinogenen Aminosäuren bestehen, die sich lediglich in ihrer Anzahl und Anordnung unterscheiden.

Der Wellenlängenbereich bis etwa 210 nm ist für die Detektion unbrauchbar, weil es dort zu einer totalen Absorption kommt. Im Bereich zwischen 210 und 240 nm fällt sie schnell ab, sodass oberhalb von 240 nm keine nennenswerte Absorption stattfindet. Eine Ausnahme bildet lediglich das bei 280 nm erscheinende, allerdings schwach ausgeprägte Absorptionsmaximum (siehe Vergrößerung in Abb. 5-10.). In der Literatur wird häufig bei 280 nm gemessen, insbesondere wenn Pufferzusätze,

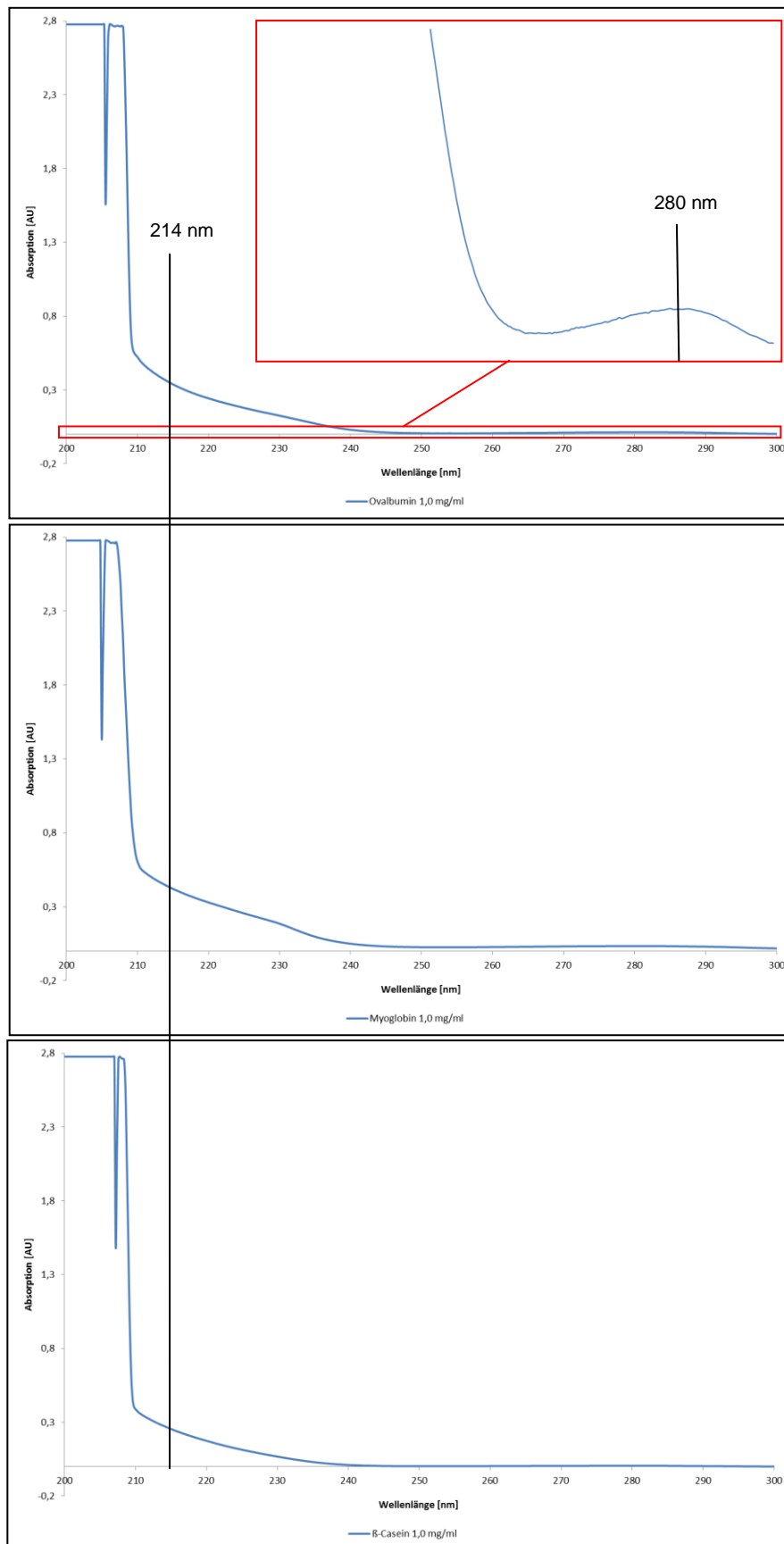


Abb. 5-10.: Beispielhafte UV-Spektren der Proteine Ovalbumin, Myoglobin und β -Casein, aufgenommen bei einer Konzentration von jeweils 1,0 mg/ml.

wie beispielsweise Arginin, eine Detektion unterhalb nicht zulassen. Für die Bestimmungsgrenze ist diese Wellenlänge allerdings aufgrund des geringen Absorptionskoeffizienten sehr unvorteilhaft.

Als ein guter Kompromiss zwischen einem Signal-overrange und einem nicht vorhandenem Signal, hat sich eine Detektionswellenlänge von 214 nm erwiesen. Abbildung 5-11. verdeutlicht den Einfluss auf die Bestimmungsgrenze. Es wurde eine Ovalbumin-Lösung mit einer Massenkonzentration von 4,0 µg/ml vermessen und sowohl bei 214 als auch bei 280 nm detektiert.

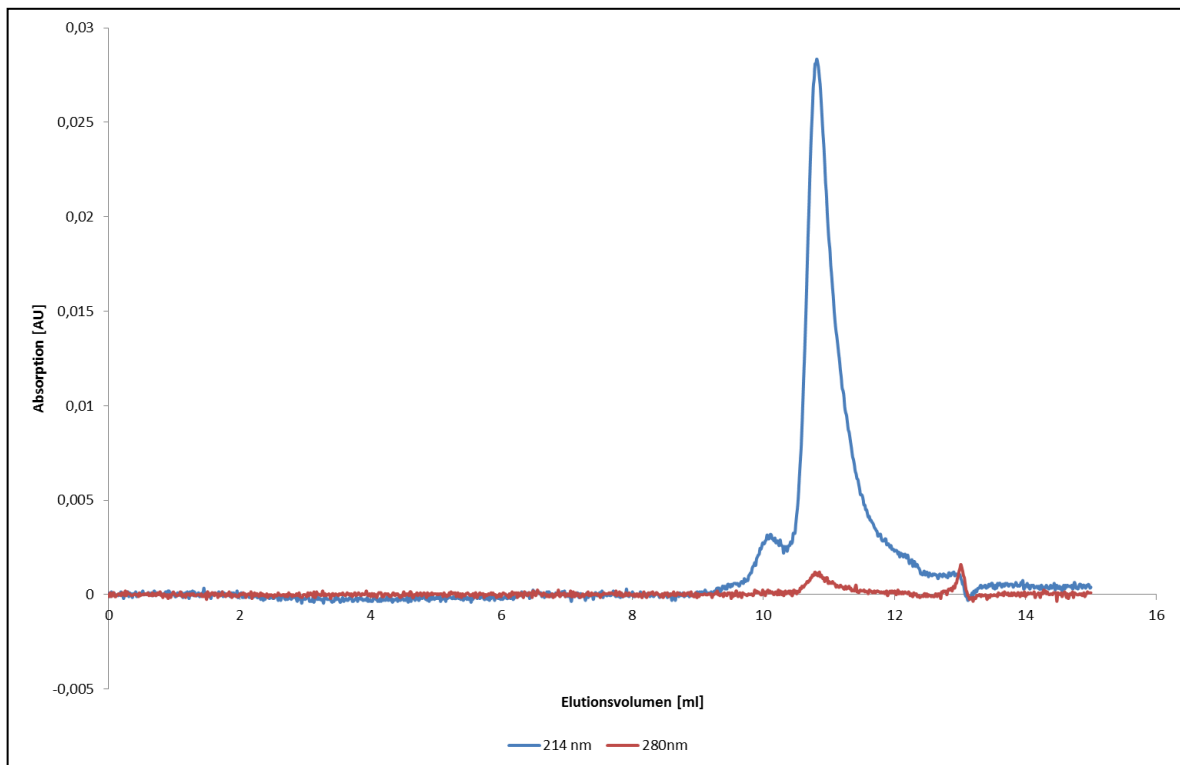


Abb. 5-11.: Überlagerte Elugramme von Ovalbumin (4,0 µg/ml) detektiert bei 214 nm (blau) und 280 nm (rot). Während bei 214 nm die LOQ mit einem S/N >> 10 noch lange nicht erreicht ist, ist bei 280 nm bereits die LOD unterschritten.

5.3.2. Problematik der Trennung von Proteinen

In den vorhergehenden Abschnitten wurde gezeigt, dass eine Quantifizierung mit der SEC und einem UV-Detektor bei einer geeigneten Wellenlänge durchaus mit einer guten Präzision möglich ist. Schwierig wird es allerdings, wenn nicht nur ein einzelnes, sondern mehrere Proteine nach einer vorhergehenden Trennung quantifiziert werden sollen.

Die für die Unterscheidung der Molmassen notwendige Massendifferenz von ca. 10% (s.o.) führt bei weitem nicht zu einer ausreichenden Trennung der Proteine. Abhängig von der erreichbaren Trennleistung ist unter realen SEC-Bedingungen nicht selten

sogar ein Massenunterschied um den Faktor 2 bis 10 für eine Basislinientrennung nötig. Aufgrund der Natur der Technik selbst ist eine Steigerung der Trennleistung oder Veränderung der Selektivität durch Optimierung der chromatographischen Bedingungen allerdings nur sehr eingeschränkt bis gar nicht möglich, ohne die idealen SEC-Bedingungen zu beeinträchtigen. Deshalb wird eine Basislinientrennung nur selten erreicht.

5.3.2.1. Quantifizierung nicht vollständig aufgelöster Peaks

Für die Quantifizierung eines gut aufgelösten Peaks kann sowohl die Peakfläche, als auch die Peakhöhe herangezogen werden, da sich beide proportional zu der Probenmenge verhalten. Die Quantifizierung über Letztere führt im Fall symmetrischer Peaks sogar zu präziseren Werten, da weniger Messkonstruktionen und somit weniger Fehler das Ergebnis beeinträchtigen [110, 111].

Bei nicht basisliniengetrennten Peaks ist eine Quantifizierung wegen der Überlappung schwierig. Ist eine Trennung auf chromatographischem Wege nicht möglich, so müssen die Peaks rechnergestützt getrennt werden. Moderne Integrationssoftware bietet dafür mannigfaltige Möglichkeiten, von denen am Häufigsten der *Perpendicular Drop* [Abb. 5-12a.], das *Tangent-skimming* [Abb. 5-12b.] und die *Peak-deconvolutioun* [Abb. 5-12c.] eingesetzt werden.

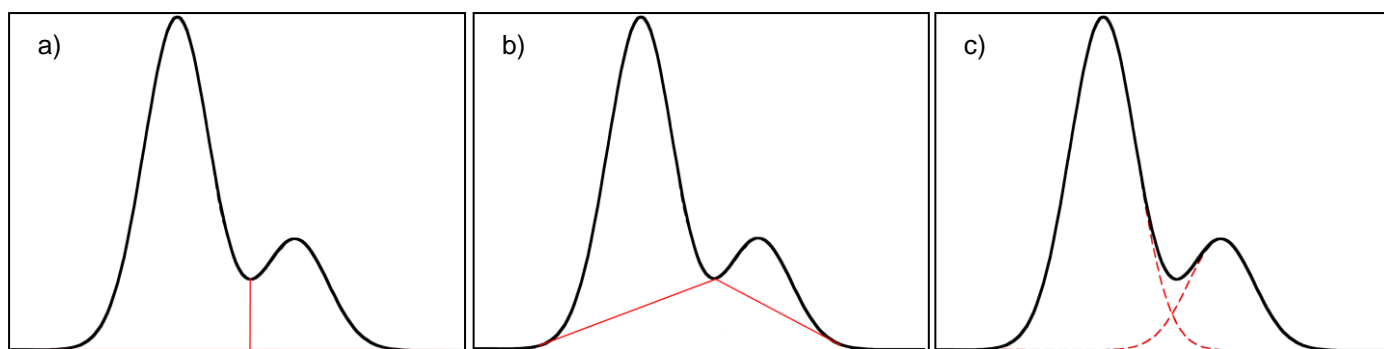


Abb. 5-12.: Der Perpendicular drop a), das Tangent-skimming b) und die Peakdeconvolution sind neben der Peakhöhenbestimmung drei Methoden zur rechnergestützten Quantifizierung bei sich überlappenden Signalen.

Diese Methoden können jedoch nur fehlerarm angewendet werden, wenn die sich überlappenden Peaks eine symmetrische Gauss-Form aufweisen [110, 111]. Ferner führt a) nur bei einem ähnlichen Peakhöhenverhältnis zu einem richtigen Ergebnis. Dagegen führt die Peakhöhenmessung ab einer Auflösung der Peaks von etwa 0,8 sogar bis zu einem Peakhöhenverhältnis von 16:1 zu richtigen Ergebnissen [30].

In der SEC sind diese Methoden prinzipiell auch anwendbar. Allerdings macht eine Besonderheit der Proteinpeaks eine fehlerarme Anwendung bei Proteintrennungen unmöglich.

Im Elugramm eines Proteins tauchen unter idealen SEC-Bedingungen sehr häufig kleine Nebenpeaks vor dem eigentlichen Proteinpeak auf [Abb. 5-13.]. Diese Peaks werden in der Literatur nur als „minor-peak“ bezeichnet [112 und dort zitierte Literatur]. Sie werden im Elugramm mit unvollständig aufgelösten Peaks von dem Hauptpeak des anderen Proteins überlagert. Dies ist bei der Molmassenbestimmung

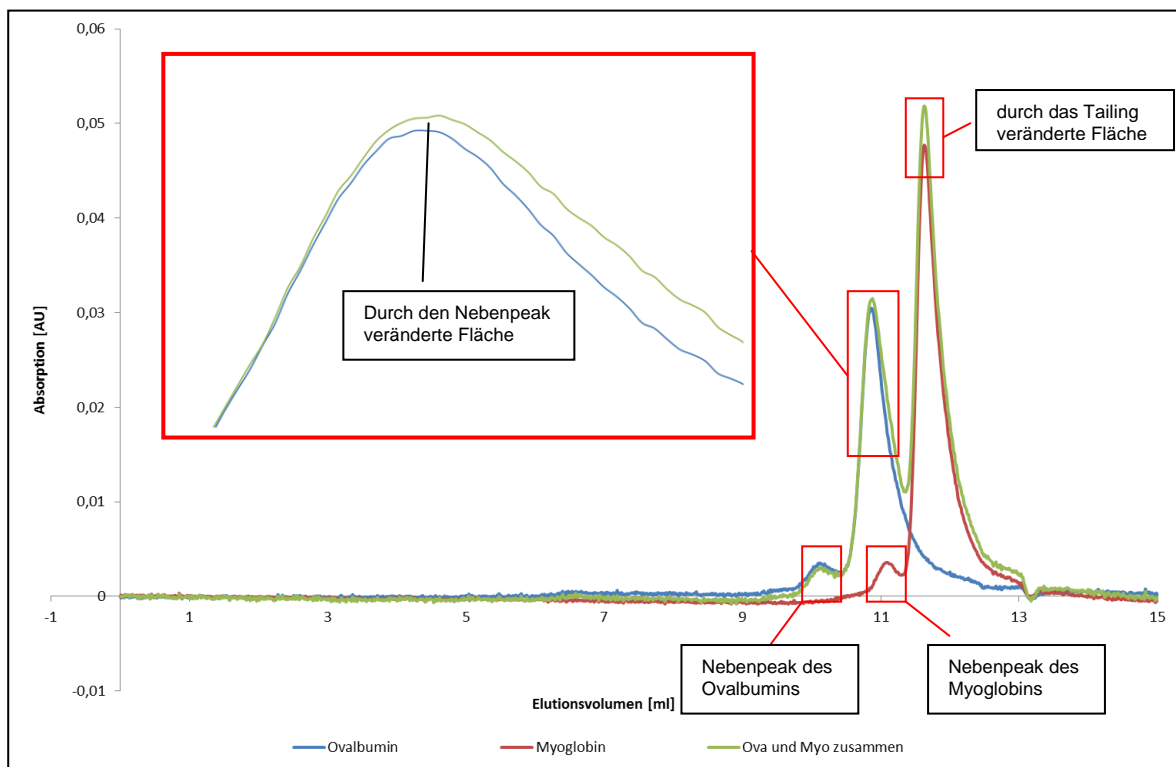


Abb. 5-13.: Trennung von Ovalbumin und Myoglobin. Die Nebenpeaks und die nicht symmetrische Form der Hauptpeaks führen zu stark verfälschten Ergebnissen bei Anwendung der Peakhöhenmessung und der in Abb. 5-12. gezeigten Verfahren.

nicht relevant, da sich die Elutionsvolumina dadurch nicht ändern. Für die Quantifizierung jedoch wird nicht nur die Fläche, sondern auch die Peakhöhe zu stark verfälscht, sodass eine Quantifizierung mit den zuvor genannten Möglichkeiten zu nicht richtigen Ergebnissen führt. Zudem sind die Proteinpeaks häufig unsymmetrisch, was ebenfalls den Fehler bei der rechnerischen Bestimmung erhöht [Abb. 5-13.].

5.3.3. Die nicht-ideale SEC: unerwünscht! Oder doch nicht?

Seit Einführung der SEC galten alle Effekte, welche die rein physikalische Trennung der Makromoleküle nach Größe beeinträchtigen, als unerwünscht und unbedingt zu vermeiden. Dies war für das ursprüngliche Einsatzfeld der SEC durchaus gerechtfertigt und sinnvoll, weswegen sich die gesamte Aufmerksamkeit auf die Identifizierung und Eliminierung solcher unerwünschten Wechselwirkungen richtete [112].

Als Anfang der 1980er Jahre Regnier und Kopaciewicz versuchten die SEC für eine Fraktionierung und Aufreinigung von Proteinen zu nutzen, kamen sie wegen der schlechten Trennleistung und des schlechten Auflösungsvermögens schnell an die Leistungsgrenzen der Technik. Um dennoch die Aufreinigung durchführen zu können, fingen sie an sich gezielt mit den als „unerwünscht“ geltenden elektrostatischen und hydrophoben Wechselwirkungen zu beschäftigen. In ihrer Arbeit „Nonideal Size-Exclusion Chromatography of Proteins: Effects of pH at Low Ionic Strength“ [112] demonstrierten sie, wie der Kapazitätsfaktor (k_d) durch Veränderung des pH-Wertes relativ zum pI des untersuchten Proteins und durch Variation der Ionenstärke, in eine bestimmte Richtung verschoben werden und sogar Werte $> k_{d(max)}$ erreichen kann. So können die ansonsten schlecht aufgelösten Proteine mit ähnlichen k_d – Werten doch noch basisliniengetrennt eluieren. Diesen gezielten Einsatz der „unerwünschten“ Wechselwirkungen nannten sie nicht ideale SEC (nSEC). Bis heute wurden keine weiteren Arbeiten zu diesem Thema veröffentlicht und die nSEC findet auch kaum Erwähnung in der Literatur. Für die Quantifizierung scheint sie allerdings sehr vielversprechend, da sie die optimalen Voraussetzungen bietet.

5.3.3.1. Entwicklung einer nSEC Methode

Unter nicht idealen SEC-Bedingungen versteht man im Allgemeinen alle Zustände, die nicht zu einer allein auf Molekülgröße basierten Trennung der Analyten führen. Selbstverständlich führen nicht alle diese Zustände zu einer verbesserten Trennung, vielmehr können einige von ihnen sogar eine Verschlechterung herbeiführen. Da durch die unterschiedlichen Eigenschaften und pI s für jedes Protein andere Bedingungen ideal sind, können folgerichtig auch keine allgemeingültigen nSEC-Bedingungen definiert werden. Bei jedem Trennproblem muss also eine individuelle nSEC-Methode entwickelt werden, die zu einer besseren Trennung und damit zu einer Quantifizierbarkeit der Proteine führt. Im Folgenden soll daher am Beispiel der

bereits verwendeten globulären Proteine Ovalbumin und Myoglobin die Entwicklung einer solchen nSEC-Methode veranschaulicht werden.

Es ist allgemein akzeptiert, dass es unter nicht idealen Bedingungen zu Wechselwirkungen der Proteine mit der stationären Phase kommt. Jedoch sollte man sich vor dem ersten Schritt zur nSEC vergegenwärtigen, warum es zu diesen Wechselwirkungen kommt, denn nur so lässt sich die Selektivität wie gewünscht verändern.

Betrachtung der Analyten:

Der pI ist eine charakteristische Eigenschaft eines Proteins. Ein Protein ist nach außen hin ladungsneutral, wenn $pH = pI$ gilt. Sinkt der pH-Wert ($pH < pI$), so kommt es zu einer vermehrten Protonierung des Proteins und zu einer positiven Nettoladung. Folglich kommt es bei steigendem pH ($pH > pI$) zu einer vermehrten Deprotonierung und somit zu einer negativen Nettoladung. Je weiter sich der pH vom pI entfernt desto größer ist der De-/ Protonierungsgrad.

Betrachtung der stationären Phase:

Häufig basieren die eingesetzten Füllmaterialien der SEC-Säulen auf Kieselgel. Trotz der weitgehenden Modifikation und Inaktivierung bleibt ein Teil der reaktiven Silanolgruppen frei. Diese werden bei pH-Werten > 2 deprotoniert und liegen negativ geladen vor.

Betrachtung der mobilen Phase:

Die mobile Phase besteht aus einem wässrigen Puffer, der den pH-Wert halten soll, und einem Salzzusatz. Dieser Zusatz liefert die nötigen Gegenionen für die deprotonierten Silanolgruppen und die evtl. geladenen Proteine, sodass elektrostatische Wechselwirkungen theoretisch ausgeschlossen werden können.

Zusammengenommen lässt sich also sagen, dass bei einer sukzessiven Senkung die Ionenstärke die elektrostatischen Wechselwirkungen immer stärker werden. Abhängig von der Nettoladung des Proteins sind dann zwei Effekte möglich. Bei einer positiven Nettoladung kommt es zusätzlich zum reinen Größenausschluss zu einer Adsorption der Proteine an die stationäre Phase. Der k_D -Wert vergrößert sich und das Protein eluiert später als in der SEC. Ist die Nettoladung negativ, stößt die stationäre Phase das Protein ab und verhindert, dass es in Poren, die groß genug

wären eindringt (engl. ion exclusion = Ionenausschluss). Das Protein eluiert also eher als in der SEC, was sich im kleineren k_D -Wert widerspiegelt.

Am Ausgangspunkt der Entwicklung einer Trennmethode im nSEC-Modus stehen die „idealen“ oder besser, die als ideal angesehen Bedingungen. Im Fall der Beispielproteine war es ein Phosphatpuffer mit $pH = 6,6$ (nach Ph.Eur.) mit 0,3 Mol NaCl-Zusatz und einer Gesamtionenstärke von ca. 0,386 mol /L. Die Trennung war - wie erwartet- unvollständig und Nebenpeaks tauchten auf [Abb. 5-14.].

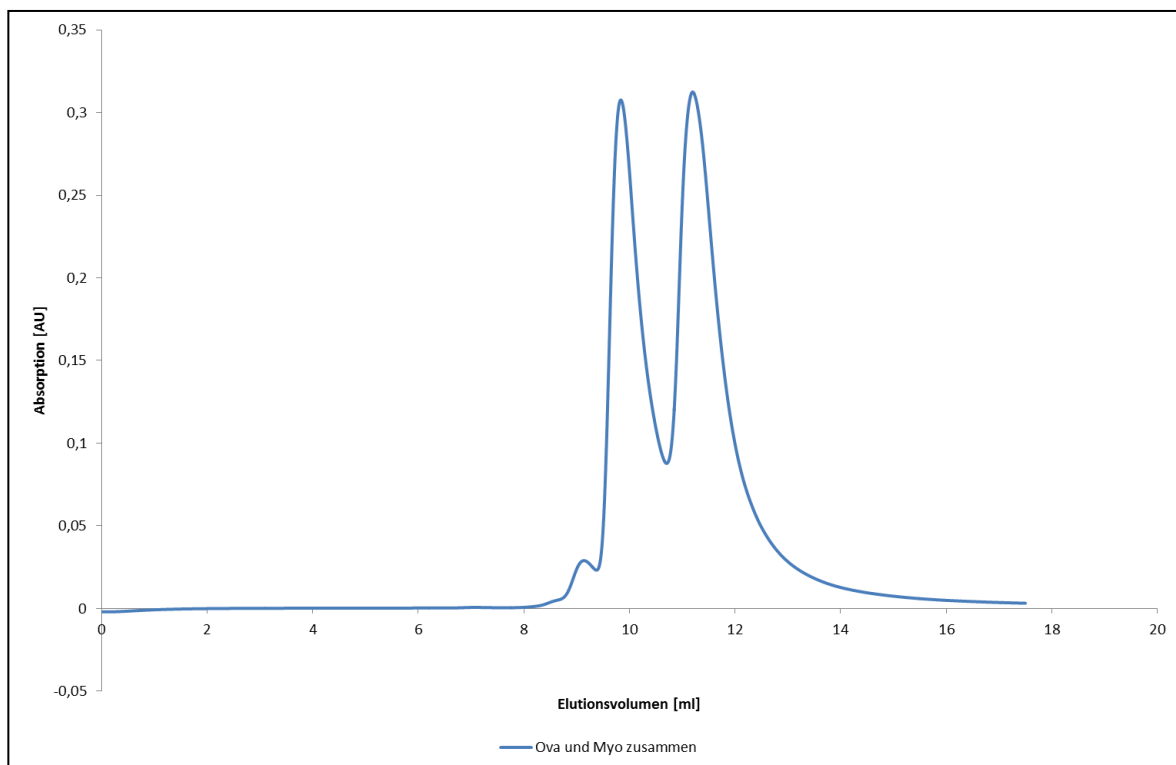


Abb. 5-14.: Am Anfang der nSEC-Methodenentwicklung stehen die „idealen“ SEC-Bedingungen. Die Proteinpeaks sind aufgrund der Überlappung und der Nebenpeaks nicht richtig quantifizierbar.

Die isoelektrischen Punkte liegen bei $pI_{\text{(Ovalbumin)}} = 4,7$ und $pI_{\text{(Myoglobin)}} = 7,3$. Regnier und Kopaciewicz erzielten gute Ergebnisse bei einem pH von 6,3 und einer niedrigeren Ionenstärke, also wurde für die nicht idealen Bedingungen der Phosphatpuffer $pH = 6,4$ (Ph.Eur.) gewählt und auf $pH = 6,3$ eingestellt ($I_C \approx 0,176$ mol/L). Unter Berücksichtigung der oben genannten Überlegungen sollte bei diesem pH -Wert das Ovalbumin eine negative und das Myoglobin eine positive Nettoladung aufweisen. Die nachfolgend durchgeführte Serie zeigte jedoch keine signifikanten Verbesserungen in der Trennung der beiden Proteine, was mit der immer noch recht

hohen Ionenstärke erklärt werden kann. Deswegen wurde die Ionenstärke bei gleichbleibendem pH schrittweise verringert. Bei $I_C \approx 0,018 \text{ mol/L}$ wurde schließlich eine Basislinientrennung erreicht [Abb. 5-15.]. Die Breite der Peaks deutet auf eine stark reduzierte Trennleistung hin, was aber für die beabsichtigte Quantifizierung nicht von Bedeutung ist. Ungeachtet dessen, lässt sich anhand der Peakformen der nSEC-Mechanismus erkennen. Der Myoglobinpeak ist niedriger und zeigt ein größeres Tailing, was typisch für adsorbierte Peaks ist. Der Ovalbuminpeak ist dagegen etwas schmaler und höher, was auf den Ionenausschluss hindeutet [112]. Die Nebenpeaks beider Proteine sind fast vollständig verschwunden und beeinträchtigen eine Quantifizierung nicht mehr.

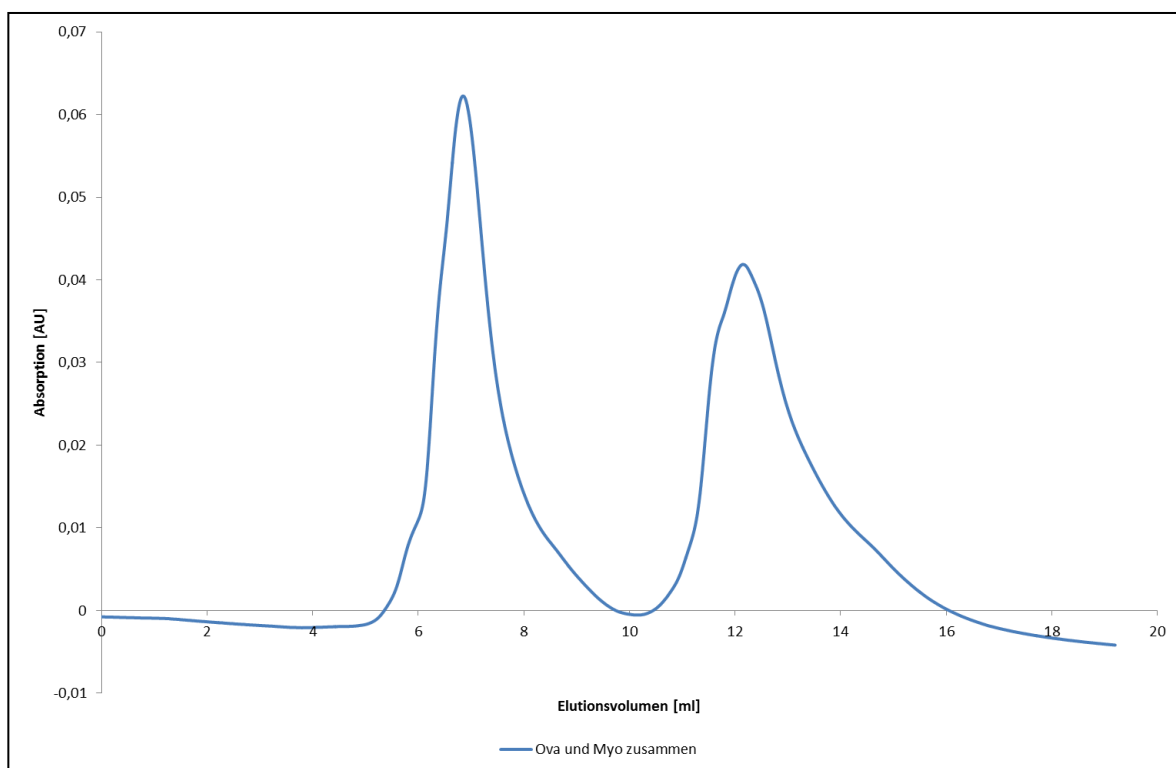


Abb. 5-15.: nSEC-Elugramm von Ovalbumin und Myoglobin. Bei einem pH -Wert von 6,3 und $I_C \approx 0,018 \text{ mol/L}$ wurde eine Basislinientrennung erreicht. Die Nebenpeaks sind noch leicht zu erkennen, beeinträchtigen die Quantifizierung aber nicht mehr.

5.3.3.2. Präzision und Linearität der Peakflächen in der nSEC

Nach einer erfolgreichen Trennung im nSEC-Modus musste gezeigt werden, dass eine Peakflächenbestimmung beider Proteine reproduzierbar durchführbar war. Dazu wurden an drei unterschiedlichen Tagen drei Serien mit $n = 20$ durchgeführt. Die Massenkonzentration β betrug jeweils $0,4 \text{ mg/ml}$. Die Wiederholstandardabweichung für das Ovalbumin lag zwischen 1,05% und 1,06% RSD. Die Mehrtagesstandardabweichung wurde mit 1,07% RSD ermittelt. Für Myoglobin ergab

sich durchweg ein etwas schlechteres Ergebnis. Hier lag die Wiederholstandardabweichung zwischen 1,44% und 1,60% während die Mehrtagesstandardabweichung 1,82% RSD betrug [Tab. 5-1.].

Tab. 5-1.: AUC-Präzisionsdaten von Ovalbumin und Myoglobin in der nSEC.

	Ovalbumin	Myoglobin
$\hat{\sigma}_{\text{Tag1}}$	1,055 %	1,436 %
$\hat{\sigma}_{\text{Tag2}}$	1,049 %	1,601 %
$\hat{\sigma}_{\text{Tag3}}$	1,064 %	1,453 %
$\hat{\sigma}_{\text{Gesamt}}$	1,073 %	1,819 %

Die Präzision der Peakflächen im nSEC-Modus unterscheidet sich nicht signifikant von der Präzision der idealen SEC und kann daher insgesamt als gut bezeichnet werden. Die schlechteren Ergebnisse des Myoglobins sind mutmaßlich auf dessen schlechtere Löslichkeit und allgemein schwierigere Handhabung dieses Proteins zurückzuführen. Es ist möglich, dass ein Lösungsvermittler -wie das Brij 35-, der das Protein nicht denaturiert, helfen kann die Präzision zu verbessern. Gegenwärtig wird dies in der Arbeitsgruppe untersucht.

Ferner wurde die Linearität der Peakflächen im Bereich zwischen 0,04 und 1 g/L geprüft. Das Bestimmtheitsmaß R^2 lag für beide Proteine über 0,999 [Abb. 5-16a,b.]. Wie schon aus den Präzisionsergebnissen erwartet, war es bei Ovalbumin etwas besser. Nichtsdestoweniger ist die Linearität für eine Quantifizierung gegeben.

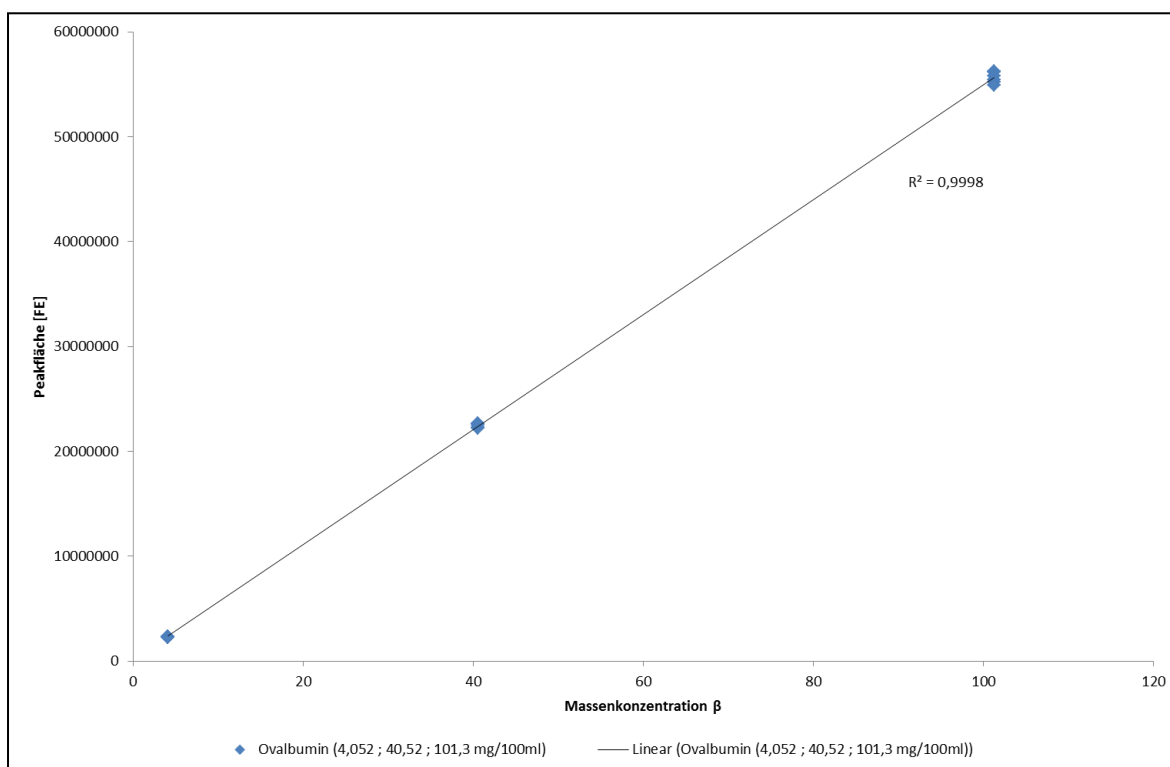


Abb. 5-16a.: Linearität der Detektorantwort für die Peakflächen des Ovalbumins im Bereich zwischen 0,04 und 1 g/L. Die tatsächliche Einwaage betrug 101,3 mg/100ml. Die anderen Massenkonzentrationen wurden durch 1:2,5 und 1:25 Verdünnungen erhalten.

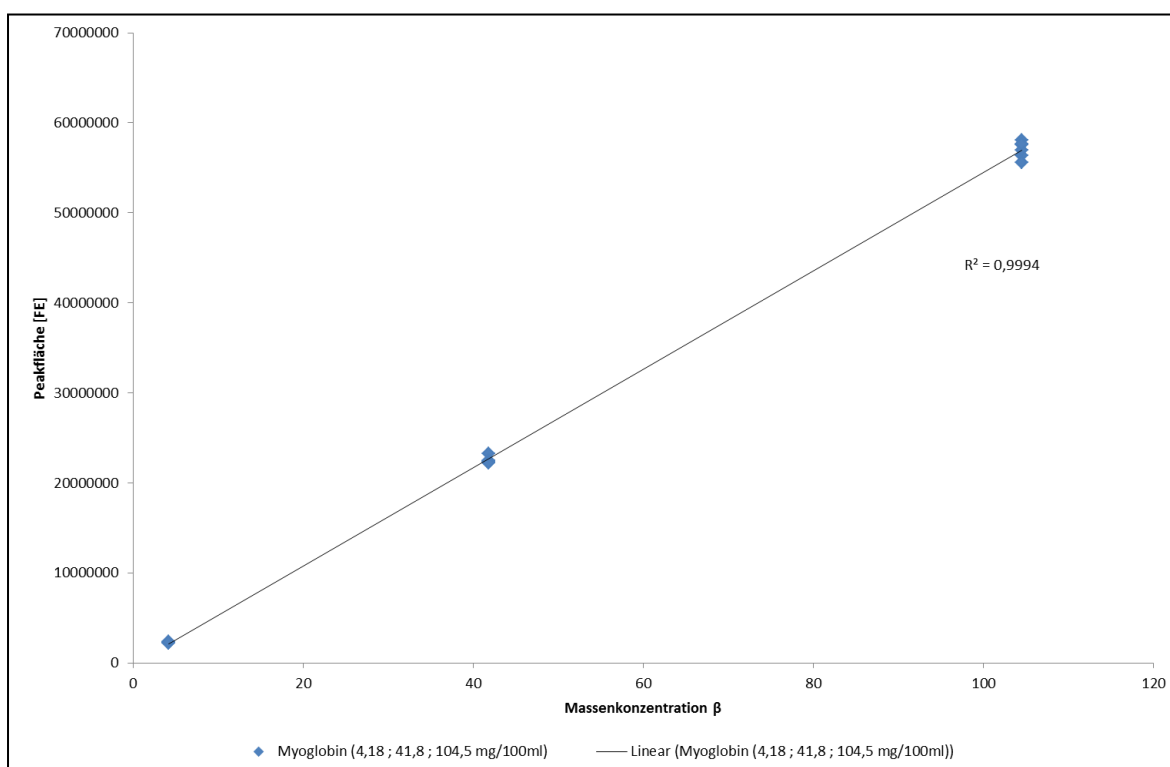


Abb. 5-16b.: Linearität der Detektorantwort für die Peakflächen des Myoglobins im Bereich zwischen 0,04 und 1 g/L. Die tatsächliche Einwaage betrug 104,5 mg/100ml. Die anderen Massenkonzentrationen wurden durch 1:2,5 und 1:25 Verdünnungen erhalten.

5.4. Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurde die Möglichkeit der Quantifizierung von Proteingemischen mittels der Hochleistungsgrößenausschlusschromatographie (HP-SEC) untersucht.

Bislang ist diese Technik lediglich für Bestimmungen von Molmassen und Molmassenverteilungen eingesetzt worden und nur in Ausnahmefällen für die quantitative Bestimmung von Reinsubstanzen. In vielen Fällen wird die HP-SEC nur als orthogonale Methode zu anderen Trenntechniken genutzt.

Es sollte daher gezeigt werden, dass diese, sowohl im Hinblick auf die Instrumentierung als auch die verwendeten Chemikalien, kostengünstige und umweltfreundliche Technik als vollwertige Alternative zu den etablierten elektrophoretischen und massenspektrometrischen Methoden angesehen werden kann.

Die in den Experimenten ermittelten Präzisionsdaten für die Elutionsvolumina (ca. 0,1% RSD) und auch für die Peakflächen (ca. 1,0% RSD) bestätigten, dass die HP-SEC durchaus für eine quantitative Bestimmung einzelner Proteine herangezogen werden kann. Bei der Verwendung einer geeigneten Detektionswellenlänge kann für Proteine eine Nachweisgrenze von teilweise $\ll 4,0 \mu\text{g/ml}$ erreicht werden. Als gut geeignet haben sich hier 214 nm erwiesen. Hinsichtlich dieser Parameter ist die HP-SEC also uneingeschränkt mit anderen HPLC-Techniken vergleichbar.

Als besondere Herausforderung hat sich allerdings die Auftrennung eines Proteingemisches vor einer Quantifizierung herausgestellt, da aufgrund der schlechten Peakkapazität eine Basislinientrennung nur bei sehr großen Unterschieden in der Molmasse erreichbar ist. Bei Molmassendifferenzen zwischen 10 und 200% überlagern sich Teile der Peaks, was eine korrekte Flächenbestimmung erschwert und in vielen Fällen sogar unmöglich macht. Durch die häufig auftretenden, sogenannten Nebenpeaks der Proteine sind auch die Bestimmung der Peakhöhe und der Einsatz von rechnerischen Methoden, wie des „Perpendicular Drop“, des „Tangent-Skimming“ oder der „Peak-Dekonvolution“ nicht möglich.

Einen Ausweg bietet hier deswegen die Anwendung der nicht idealen SEC (nSEC). Dabei werden die, in der SEC sonst streng vermiedenen, Wechselwirkungen zwischen den Analyten und der stationären Phase bewusst herbeigeführt, um für eine gezielte Veränderung der Selektivität und dadurch eine verbesserte Auflösung der Peaks zu sorgen. Eine Bestimmung der Molmassen ist so natürlich nicht mehr

möglich, dafür können die Proteine zuverlässig quantifiziert werden. Für den Wechsel zwischen SEC und nSEC sind keine instrumentellen Änderungen notwendig. Sowohl HPLC-Anlage als auch die SEC-Säule bleiben unverändert, lediglich die Zusammensetzung der mobilen Phase ist entscheidend. Auf diese Weise kann relativ schnell und ohne viel Arbeits- und Zeitaufwand zwischen den beiden Betriebsmodi gewechselt werden. Die nSEC ist daher, wie auch die ideale SEC, in der Durchführung unkompliziert und schnell. Jedoch kann die maximale Analysendauer höher als V_t sein, da Proteine mit positiver Nettoladung adsorbiert werden. Dieser Effekt ist aber nicht so stark wie die Wirkung des Ionenausschlusses [vgl. Abb. 5-14. und 5-15.], sodass die sorptiven Peaks nicht deutlich später als V_t eluieren. Weiterhin wird bei der nSEC auch der isokratischen Modus angewendet, was eine lange Equilibrierung nach jedem Lauf, wie sie z.B. in der Ionenaustauschchromatographie nötig ist, erübrigt und in einer Analysenserie die einzelnen Läufe direkt hintereinander gestartet werden können.

Ein Nachteil dieser Technik ist die recht aufwändige Methodenentwicklung. Aufgrund der Unterschiede bei Proteinen, was Struktur, Lösungsverhalten, Isoelektrischen Punkt etc. betrifft, kann keine allgemeine nSEC-Methode empfohlen werden. Für jedes Gemisch muss die mobile Phase unter Beachtung der Proteineigenschaften individuell hergestellt werden. Dabei ist selbst bei guter Kenntnis der untersuchten Proteine, was sicherlich nicht immer der Fall ist, keineswegs eine direkte Herstellung der optimalen mobilen Phase möglich. Diese muss vielmehr durch schrittweise Annäherung ausgetestet werden.

6. Transfer Analytischer Methoden

In der Pharmazeutischen Industrie müssen stetig neue Methoden für neu auftauchende analytische Fragestellungen entwickelt werden. Gerade in Zeiten des wachsenden wirtschaftlichen Drucks aufgrund von Rationalisierungen der Produktionsstätten, Fusionen von Pharmazeutischen Unternehmen und analytischer Lohnarbeit, geschieht dies zentral entweder in Entwicklungslaboratorien des Pharmazeutischen Unternehmens selbst oder eben im Lohnauftrag. Am Ende eines solchen Prozesses muss die fertige und validierte Methode aus dem Entwicklungslabor (*sendende Einheit*) dahin transferiert werden, wo sie anschließend in der analytischen Routine eingesetzt werden soll (*empfangende Einheit*). Dabei kann es sich z. B. um ein am Produktionsstandort befindliches Labor der Qualitätskontrolle / Qualitätssicherung des eigenen Unternehmens oder des Auftraggebers handeln. Der Transfer von Methoden ist damit zu einem wichtigen Bestandteil des Life Cycle Management eines Produktes geworden [113]. Infolgedessen hat seine Organisation eine bedeutende Stellung innerhalb des Qualitätssicherungssystems eingenommen.

Der Code of Federal Regulations (CFR) der Vereinigten Staaten sieht im 21CFR §211.165 als Anforderung für die gute Herstellungspraxis vor, dass die Richtigkeit, Empfindlichkeit, Spezifität und Reproduzierbarkeit analytischer Methoden von einem Unternehmen festgelegt und dokumentiert werden müssen [114]. Ferner besagt das 21CFR 211.194, dass der Nachweis der Eignung einer analytischen Methode unter realen Bedingungen erbracht werden muss [115]. Diese Anforderungen können entweder durch vor Ort validierte Methoden oder aber durch den Nachweis eines gelungenen Transfers einer Methode erfüllt werden. Das Arzneibuchforum der US Pharmakopöe hat sich bereits dieses wichtigen Themas angenommen und im Jahr 2009 einen Vorschlag von Quatrocchi et al. zur Diskussion angenommen. In diesem Stimulus-Paper beschreiben die Autoren verschiedene Möglichkeiten eines Methodentransfers [116]. Weil es zurzeit aber weiterhin keine verbindlichen Richtlinien gibt, haben verschiedene Aufsichtsbehörden und Expertengremien (FDA, MCA, HPB und AAPS) in Zusammenarbeit mit der International Society of Pharmaceutical Engineering (ISPE) einen Leitfaden (ISPE guide on technology transfer) [29] publiziert. Dieser bildet eine gute Grundlage für eigene Anpassungen von Transfersituationen, indem er sowohl Versuchsdesigns samt Akzeptanzkriterien

als auch nützliche Checklisten und Vorlagen für Transferprotokolle bietet. Mehr dazu in [113, 117-119].

Es sei angemerkt, dass dieses Kapitel lediglich die Erweiterung des ISPE-Konzepts und eine Anleitung zur Auswahl der Akzeptanzgrenzen und Durchführung der Testung vorstellen soll. Für einen einfacheren Zugang des Lesers zu diesem Thema wird auch das Konzept eines Äquivalenztests kurz vorgestellt. Die dafür verwendeten Szenarien und Beispiele beziehen sich zum großen Teil auf die Arbeiten von Dr. Udo Schepers [26, 91, 92, 120], die dem Leser auch als weiterführende, ausführliche Quellen zu diesem komplexen Thema empfohlen werden.

6.1. Warum kein t-Test?

Der Erfolg eines Transfers wird in der Regel durch statistische Tests überprüft. Einer davon, der dafür eingesetzt wird, ist der klassische zweiseitige t-Test. Leider birgt dieser Test einen Nachteil, welcher anhand des nachfolgenden Beispiels kurz erläutert werden soll:

Eine Methode der quantitativen Analyse, die den Gehalt eines Arzneistoffs (engl. Active Pharmaceutical Ingredient = API) zwischen 95% und 105% des Sollwertes überwachen soll, wird im sendenden Labor entwickelt und erreicht nach der Validierung eine relative Standardabweichung von 0,2 %. Im empfangenden Labor kann in der Routine RSD = 0,3% ermittelt werden. Beide Labors erzielen also sehr präzise Daten. Bei der Analyse einer gleichen Probe derselben Charge findet das sendende 100,1% und das empfangende 99,6% des Sollwertes.

Man würde also sagen, dass beide Labore nicht nur sehr präzise, sondern zudem auch richtige Ergebnisse liefern und somit der Transfer ein Erfolg war. Doch ein zweiseitiger t-Test mit $n = 18$ Messwerten stellt einen signifikanten Unterschied der Ergebnisse fest und der Transfer muss abgelehnt werden. In diesem Fall aber wäre die Ablehnung ein Fehler, da die Methode unbestreitbar bestens für ihren Einsatz geeignet ist, da beide Labore zu richtigen Ergebnissen kommen.

Diese Fehleinschätzung ist durch die Natur des t-Tests bedingt. Getestet wird nämlich, ob der wahre Wert, bzw. der Referenzwert θ_0 in das, um den ermittelten Wert θ , gebildete Konfidenzintervall (Gl. 30a,b) [Abb. 6-1] fällt. Aber gerade dieses Konfidenzintervall wird mit steigender Präzision und Stichprobenzahl –eigentlich wünschenswerte Eigenschaften bei einer Testung– immer kleiner, sodass die

Wahrscheinlichkeit der Ablehnung eines in Wirklichkeit gelungenen Methodentransfers steigt [Abb. 6-2].

Offensichtlich ist also ein t-Test nicht geeignet einen Methodentransfer zu beurteilen. Eben diese Problematik wurde 2009 unter anderem von Hauck et al. in ihrem Stimulus Paper „Acceptable, Equivalent or Better“ beschrieben und im Forum der US-Pharmakopöe diskutiert [121].

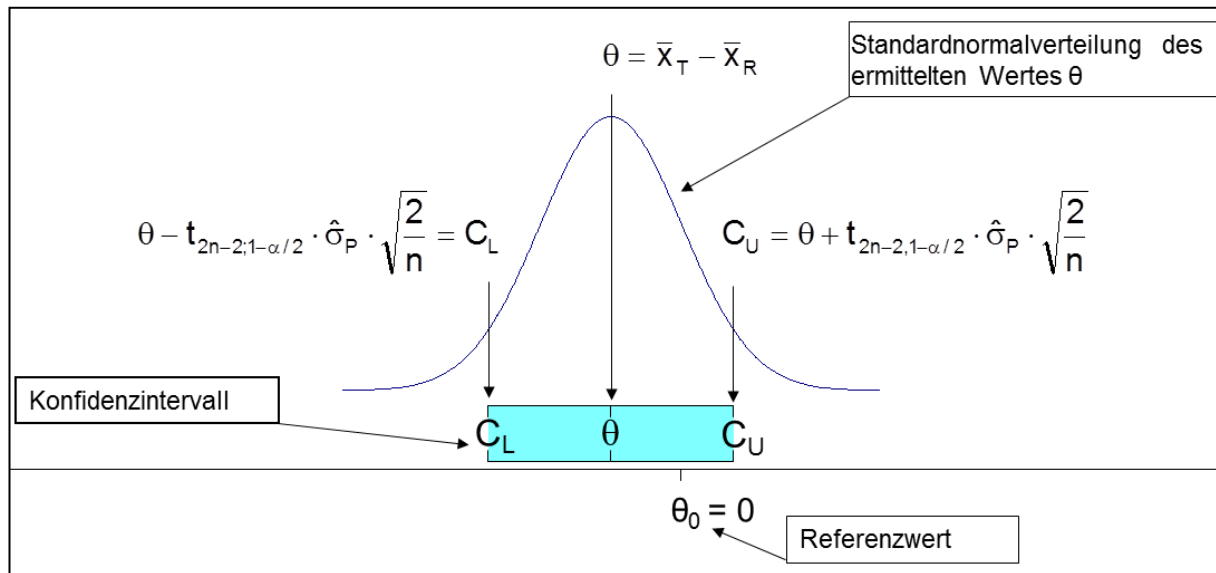


Abb. 6-1.: Um den ermittelten Wert θ wird ein Konfidenzintervall mit den Grenzen $C_{L(\text{lower})}$ und $C_{U(\text{upper})}$ nach Gl. 30a und b gebildet. In diesem Intervall liegt mit einer Wahrscheinlichkeit von $1-\alpha$ die wahre Differenz der Mittelwerte. Liegt der Referenzwert θ_0 innerhalb des Konfidenzintervalls, so geht man von einem nicht signifikanten (zufälligen) Unterschied beider Werte aus.

$$C_L = \theta - t_{2n-2; 1-\alpha/2} \cdot \hat{\sigma}_P \cdot \sqrt{Y} \quad (\text{Gl. 30a})$$

$$C_U = \theta + t_{2n-2; 1-\alpha/2} \cdot \hat{\sigma}_P \cdot \sqrt{Y} \quad (\text{Gl. 30b})$$

C_L = untere Grenze des Konfidenzintervalls

C_U = obere Grenze des Konfidenzintervalls

t = Wert der Student-Verteilung mit $2n-1$ Freiheitsgraden und der Irrtumswahrscheinlichkeit α

$Y = 1/n_1 + 1/n_2 \rightarrow$ Wenn $n_1 = n_2$, $Y = 2/n$

θ_0 = Referenzwert

θ = ermittelte Zielgröße als Lageparameter (vgl. 6.1.1.)

x_T = Mittelwert des sendenden Labors

x_R = Mittelwert des empfangenden Labors

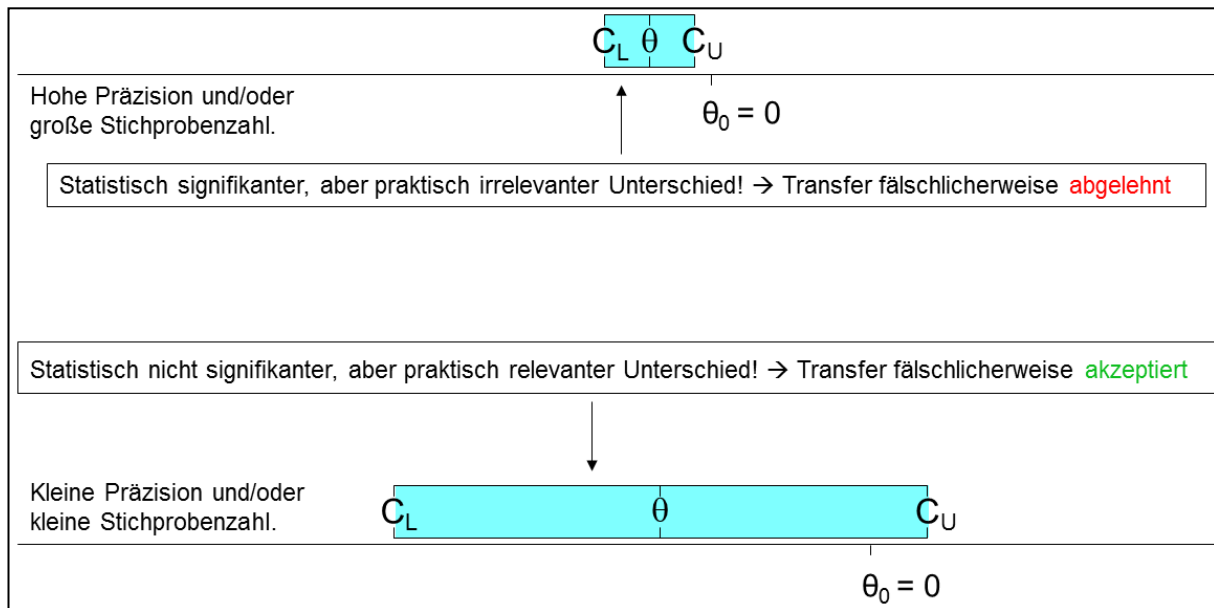


Abb. 6-2.: Der t-Test belohnt paradoxerweise unpräzises Arbeiten mit kleinen Stichprobenzahlen, da das Konfidenzintervall mit steigendem $\hat{\sigma}_p$ und sinkendem n größer wird. So können nach ordentlich durchgeführten Transfers einwandfreie Methoden verworfen und bei schlecht durchgeführten Transfers schlechte Methoden akzeptiert werden.

Es ist in den Naturwissenschaften häufig notwendig experimentell ermittelte und deshalb fehlerbehaftete Werte miteinander zu vergleichen. So z.B. beim Vergleich zweier Chargen, bei der Bestimmung von Richtigkeit und Wiederfindungsrate, bei der Beurteilung von Stabilitätsuntersuchungen und nicht zuletzt bei Bioäquivalenzstudien. In diesen Fällen können Äquivalenztests eingesetzt werden, um die oben erwähnten paradoxen Situationen zu vermeiden [26, 122].

6.1.1. Das Konzept eines Äquivalenztests

Äquivalenztests wurden in den 1970er von W.J. Westlake für Bioverfügbarkeitsstudien entwickelt und im Rahmen eines Bioäquivalenznachweises vorgestellt [28]. Sie werden angewendet, um zu entscheiden, ob ein ermittelter Schätzwert innerhalb eines bekannten Intervalls liegt [123] und können somit auch bei den obengenannten Problemstellungen eingesetzt werden. Wie bei allen statistischen Tests geschieht dies mit einer gewissen Irrtumswahrscheinlichkeit α . Bei den Äquivalenztests sind die Teststatistiken gleich denen beim t- oder F-Test, allerdings unterscheiden sich die Hypothesen.

Im Gegensatz zu dem t-Test, wo nur der Referenzwert θ_0 mit dem Konfidenzintervall von θ verglichen wird, vergleicht der Äquivalenztest eben dieses mit einem Akzeptanzintervall (auch Intervall der Relevanz) von θ_0 [Abb. 6.3a,b.]. Für jeden

Lageparameter θ ($\mu_1 - \mu_2$, μ_1 / μ_2 oder $\hat{\sigma}_2^2 / \hat{\sigma}_1^2$) kann auch beim Äquivalenztest ein $(1 - 2\alpha)$ Konfidenzintervall mit C_L und C_U erstellt werden, dessen Größe ebenfalls von der Irrtumswahrscheinlichkeit, der Streuung und der Stichprobengröße abhängt. Berechnet werden die Grenzen jedoch anders als beim t-Test (Gl. 31a,b) [92, 124]. Idealerweise ist der Lageparameter gleich 0, wenn Differenzen zweier Werte (z.B. $\mu_1 - \mu_2$) betrachtet werden. Er ist gleich 1, wenn Quotienten betrachtet werden (z.B. $\hat{\sigma}_2^2 / \hat{\sigma}_1^2$).

$$C_L = 100 \cdot [(\bar{x}_1 / \bar{x}_2) e^{-(t_{\alpha, (2n-2)} \hat{\sigma})} - 1] \quad (\text{Gl. 31a})$$

$$C_U = 100 \cdot [(\bar{x}_1 / \bar{x}_2) e^{+(t_{\alpha, (2n-2)} \hat{\sigma})} - 1] \quad (\text{Gl. 31b})$$

dabei gilt:

$$\hat{\sigma} = \sqrt{\frac{1}{2n} \cdot (\hat{\sigma}_1^2 + \hat{\sigma}_2^2) \cdot (1/\bar{x}_1^2 + 1/\bar{x}_2^2)} \quad (\text{Gl. 32})$$

\bar{x}_1 und \bar{x}_2 : sind die Mittelwerte der beiden Labore

$\hat{\sigma}_1$ und $\hat{\sigma}_2$: sind die Standardabweichungen der beiden Labore

Darüber hinaus wird um den Referenzwert θ_0 ebenfalls ein symmetrisches Intervall mit einer unteren ($\theta_0 - \varepsilon$) und einer oberen ($\theta_0 + \varepsilon$) Akzeptanzgrenze (engl. acceptance limit = AL) gebildet. Diese Akzeptanzgrenzen, die zeitgleich auch die maximale tatsächliche Abweichung zwischen den Laboren (engl. bias) darstellen, werden entweder von Aufsichtsbehörden oder von einem Unternehmen selbst in SOPs spezifiziert. Als geeignet hat sich ein Wert von 2% erwiesen, wenn Methoden zur Quantifizierung von APIs verglichen werden [29]. Es ergibt sich dann also ein Akzeptanzintervall zwischen $\theta_0 - 2\%$ und $\theta_0 + 2\%$.

Die Äquivalenzhypothese besagt, dass der ermittelte Wert θ samt seinem Konfidenzintervall innerhalb des Akzeptanzintervalls des Referenzwertes θ_0 liegt (\rightarrow beide Werte sind äquivalent). Da aber nur die Annahme der Alternativhypothese (H_1) statistisch abgesichert ist (s. Abschnitt 4.4.3.1.), muss die Aufstellung der Hypothesen (Gl. 33 und 34) wie folgt lauten:

$$H_0: \theta \leq \theta_0 - \varepsilon \text{ oder } \theta \geq \theta_0 + \varepsilon \quad (\text{Gl. 33})$$

$$H_1: \theta_0 - \varepsilon < \theta < \theta_0 + \varepsilon \quad (\text{Gl. 34})$$

Die Nullhypothese (H_0) wird demzufolge akzeptiert, wenn das Konfidenzintervall ganz oder auch nur teilweise außerhalb des Akzeptanzintervalls liegt [Abb. 6.3b.]. Sie wird zugunsten von H_1 verworfen, wenn das Konfidenzintervall komplett innerhalb des Akzeptanzintervalls liegt [125]. Es kann dann auf Gleichheit der Werte geschlossen werden.

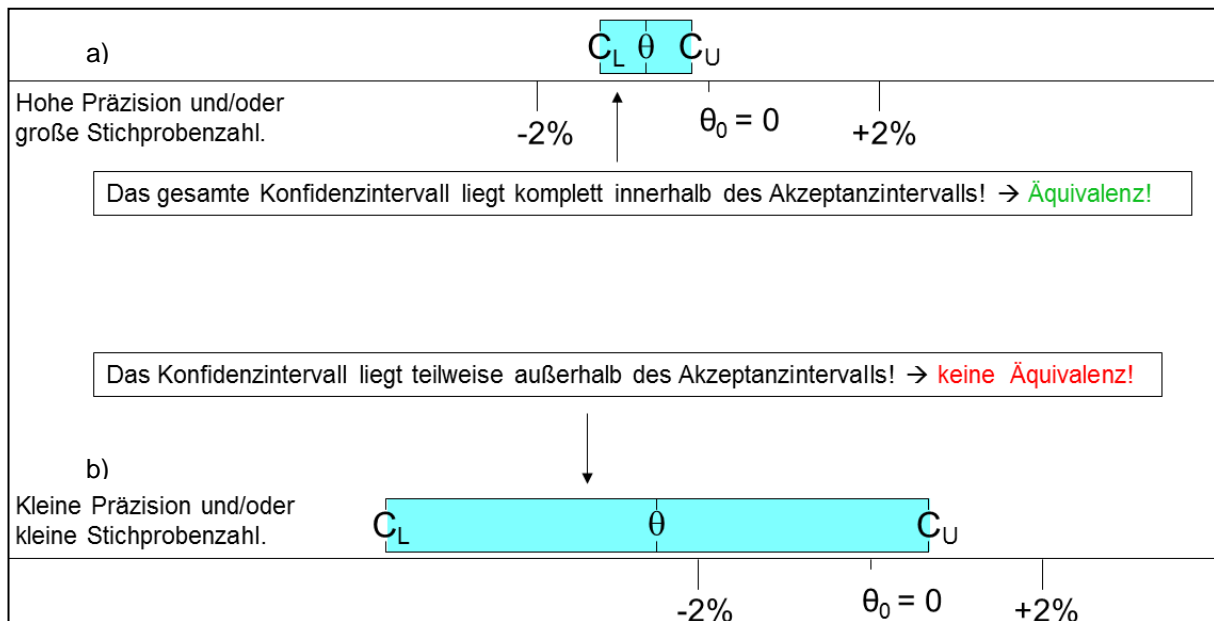


Abb. 6-3.: Je kleiner das Konfidenzintervall, desto eher passt es in das Akzeptanzintervall. Ein Äquivalenztest belohnt also präzises Arbeiten mit größeren Stichprobenumfängen. (angelehnt an Abb. 2.6-3 aus [26])

6.1.2. Vorteile gegenüber dem Zwei-Stichproben t-Test

Es wurde gezeigt, dass die zentrale Frage bei dem Transfer von Methoden lautet, ob die Differenz zwischen zwei Werten noch tolerierbar ist. Oder anders gefragt: Ist sie größer als der zulässige Bias? Ein Äquivalenztest kann diesen Sachverhalt klären, ein t-Test jedoch nicht. Dies wird bei dem Vergleich von Abbildung 6-4. und 6-5. deutlich.

Der zweiseitige t-Test kontrolliert das Risiko einen erfolgreichen Methodentransfer zu Unrecht zu verwerfen (Fehler 1. Art = α -Fehler) mit 5% bei einem Bias von 0% (Pfeil in Abb. 6-4.). Auch der Äquivalenztest kontrolliert den α -Fehler mit 5%, allerdings an der Akzeptanzgrenze, also bei einem Bias von 2% (Pfeil in Abb. 6-5.). Zudem bedeutet beim Äquivalenztest aufgrund der Hypothesenumkehr ein Fehler 1. Art, also

die fälschliche Annahme von H_1 , dass ein unzureichender Methodentransfer als gültig angesehen wird. Das Risiko des α -Fehlers kann aber zuverlässig mit einer frei wählbaren Irrtumswahrscheinlichkeit ($\alpha = 5\%$ gilt als signifikant, $\alpha = 1\%$ gilt als hoch signifikant) überwacht werden. Ferner wird aus Abbildung 6-5. deutlich, dass beim Äquivalenztest der α -Fehler unabhängig von der jeweiligen Methodenpräzision überwacht wird. Auf der anderen Seite steht beim Äquivalenztest der β -Fehler (auch Fehler 2. Art) für das Risiko einen erfolgreichen Methodentransfer abzulehnen und zu wiederholen. $1 - \beta$ (auch Power) ergänzt β zu 100% und gibt somit die Wahrscheinlichkeit der korrekten Annahme einer spezifischen Alternativhypothese an.

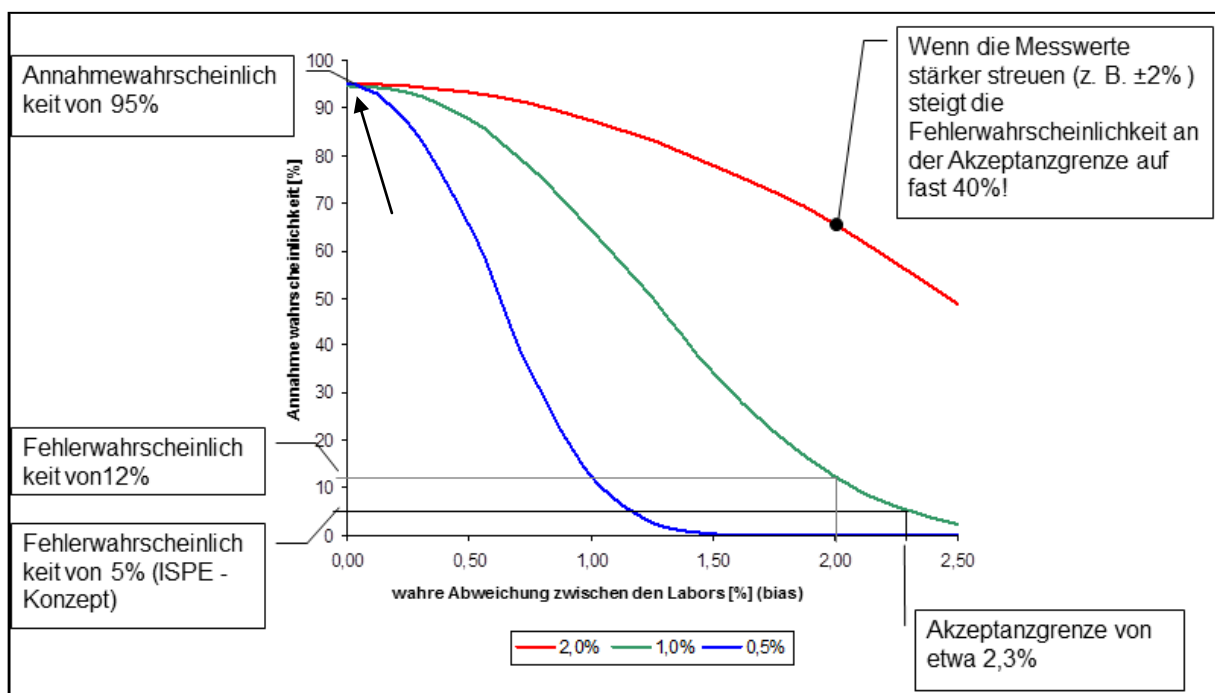


Abb. 6-4.: Annahmewahrscheinlichkeiten des t-Tests. Man erkennt, dass sie abnehmen, je größer die tatsächliche Abweichung zwischen den Labors wird. Man sieht auch, dass sie umso schneller abnehmen, je präziser die Methoden sind (0,5%; 1,0% und 2,0% sind die RSD%-Werte von drei verschiedenen Laboren) (angelehnt an Abb. 2.6-5 aus Ref. 26).

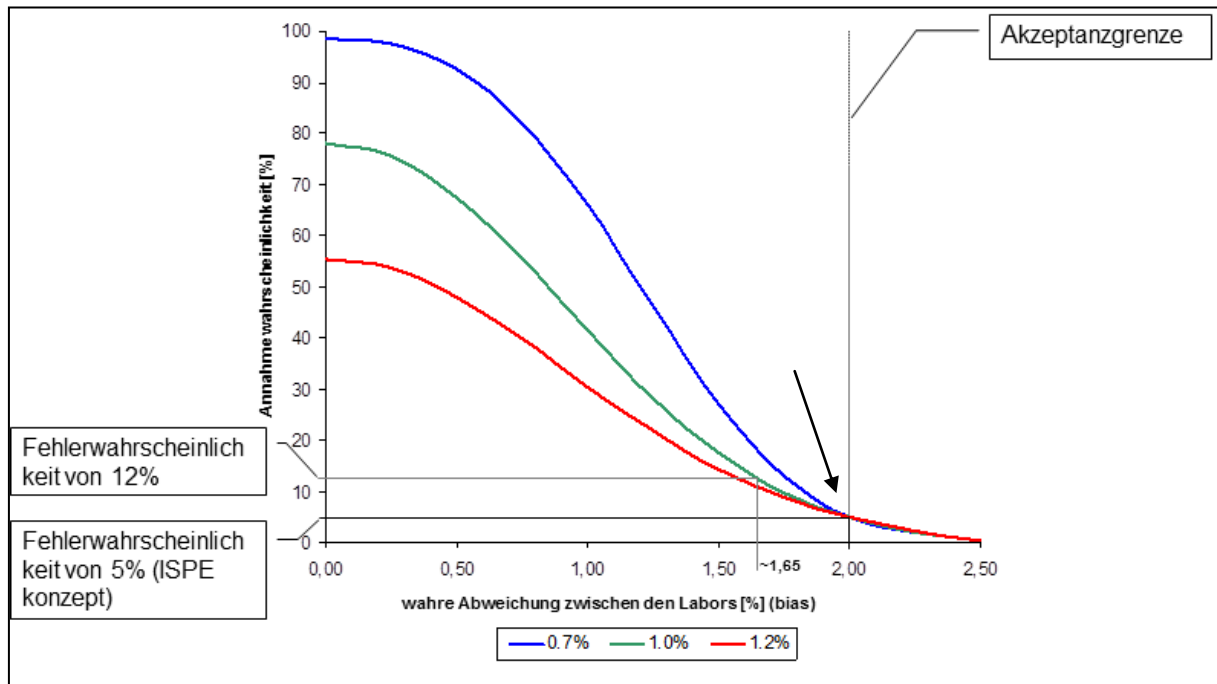


Abb. 6-5.: Beim Äquivalenztest wird das Risiko einen schlechten Transfer anzunehmen mit 5% kontrolliert und zwar bei einem tatsächlichen Bias von 2%. Diese Transfersituationen unterscheiden sich lediglich in ihrer Präzision (0,7%; 1,0% und 1,2%). (angelehnt an Abb. 2.6-8 aus Ref. 26).

Sowohl der Bias als auch die Laborpräzision beeinflussen die Power ($1 - \beta$). Bei sinkendem Bias steigt die Power und zwar umso mehr, je höher die Laborpräzision ist. Dies zeigt noch einmal, dass ein Äquivalenztest präzises Arbeiten belohnt.

6.2. Das ISPE-Konzept: Möglichkeiten und Grenzen

Das von den Aufsichtsbehörden in Zusammenarbeit mit der ISPE (engl. International Society of Pharmaceutical Engineering, zu Deutsch etwa: Internationale Gesellschaft für Pharmazeutische Entwicklung) veröffentlichte Handbuch [29] ist heute der allgemein am besten akzeptierte Leitfaden für den Transfer analytischer Methoden. Die ISPE verzichtet darin auf die Durchführung des zweiseitigen t-Tests zugunsten der oben beschriebenen Äquivalenztests. Als Akzeptanzgrenzen ($=\text{Bias} = \epsilon$) sieht das Konzept einen festen Wert $\pm 2\%$ vor. Es sind aber gerade diese festen 2%, die den ansonsten fortschrittlichen Ansatz der ISPE behindern. In diesem Fall sind entweder eine außerordentlich hohe Messpräzision, oder aber sehr aufwändige Versuchsdesigns notwendig, um eine ausreichend hohe Power zu erhalten [92, 126]. Angenommen das ISPE-Design für Methodentransfers mit „mindestens zwei Analytiker pro Labor, die unabhängig drei gleiche Proben jeweils dreimal untersuchen“ [29] wird auf zwei Labore angewendet, die insgesamt eine relative

Standardabweichung von 0,37% RSD nicht überschreiten. In diesem Fall wird eine Power von 89% erreicht [Abb. 4.2-2 in 26], d.h. das Design funktioniert bestens. Würden die Labore aber eine etwas schlechtere RSD% von 0,62%, was immer noch ein ausgezeichnetes Ergebnis wäre, so würde die Power auf knapp 50% (für das Design 2*3*3) fallen. Um diesen Verlust auszugleichen müsste ein weiterer Analytiker hinzugezogen werden (Design 3*3*3), was einen Anstieg der Power auf 88% bewirken würde. Aus den Arbeiten von Schepers et al. lässt sich als Faustregel ableiten, dass bei jedem Anstieg der RSD% um 0,2%, ein weiterer Analytiker hinzugezogen werden muss, um die gewünschte Power beizubehalten.

Den größten Anteil am Gesamtfehler $\hat{\sigma}_{\bar{x}}$ hat der Fehler $\hat{\sigma}_{AN}$, der durch den Analytiker selbst entsteht. Er ist meistens unbekannt und führt, wenn er zu groß wird, entweder zu einem erhöhten Risiko einen gelungenen Transfer abzulehnen, oder aber zu einem enormen Arbeitsaufwand, um die Power wieder zu steigern. Deshalb soll ein erweitertes ISPE Konzept helfen, diese Nachteile zu vermeiden.

6.3. Das erweiterte ISPE-Konzept

Um das Originalkonzept der ISPE anwenden zu können, muss also $\hat{\sigma}_{AN}$ möglichst klein gehalten werden. Wie zuvor erwähnt ist diese Fehlerkomponente meist unbekannt und muss daher geschätzt werden, da eine genaue Bestimmung selbst hohe Datenmengen benötigt und somit den Aufwand weiter intensivieren würde. Einem erhöhten $\hat{\sigma}_{AN}$ ($\geq 0,6\%$) kann man zum einen, wie oben beschrieben mit mehr Analytikern begegnen, zum anderen aber mit geänderten Akzeptanzgrenzen, da die Anzahl an Daten, die für eine bestimmte Power notwendig sind, nicht nur von ihrer Variabilität, sondern eben auch von den Akzeptanzgrenzen (AL) abhängt.

6.3.1. Aufgeweitete Akzeptanzgrenzen und der Skalierungsfaktor

Die vorgegebenen AL sind von der ISPE gewählt worden, weil 2% ein gängiger Toleranzwert für die Kontrolle von APIs (z.B. soll der Gehalt zwischen 98 und 102% liegen) ist. Es können also größere ALs definiert werden, wenn die Methode weitere Grenzen erlaubt. Die ALs sollten dann \leq der Toleranzgrenzen der Methode sein. Prinzipiell könnten die ALs jedoch noch großzügiger gewählt werden, da der Äquivalenztest aufgrund seiner Testcharakteristik zusätzliche Schutzmaßnahmen besitzt.

Man kann sagen, dass für eine Methode mit einer Toleranzgrenze von $\pm 2\%$ die Wahl von 2,25% als Akzeptanzgrenzen vernünftig erscheint. Das basiert auf der folgenden Überlegung: Betrachtet man die grüne Kurve (1,0% RSD) in Abbildung 6-3., so kann man bei der Akzeptanzgrenze von 2% eine Fehlerwahrscheinlichkeit von 12% ablesen. Somit entsprechen die (von der ISPE geforderten) 5% Fehlerwahrscheinlichkeit einer Akzeptanzgrenze von ca. 2,3%. Im Äquivalenztest hingegen liegen die 5% genau auf der Akzeptanzgrenze von 2%, sodass hier die ermittelten 12% einem Bias von 1,65% entsprechen.

Es erscheint aber sinnvoll für beide Tests die gleichen Fehlerwahrscheinlichkeiten an der Akzeptanzgrenze zu erlauben. So können die 12% Fehler im Äquivalenztest von 1,65% auf 2% verschoben werden, oder anders gesagt, kann die gesamte Fehlerverteilungskurve verschoben werden, indem man sie mit dem Faktor 2/1,65 skaliert. Damit würde sich die Akzeptanzgrenze von 2% auf 2,42% verschieben.

Diese Überlegungen lassen sich auf alle ALs anwenden. Die aus den t-Tests stammenden ALs können also mit einem Faktor von 1,15 multipliziert werden und die so erhaltenen Werte werden im Äquivalenztest als neue ALs eingesetzt.

6.3.2. Prozentuale Akzeptanzgrenzen (%AL)

In ihren Arbeiten entwickelten Schepers et al. ein Diagramm, aus welchem sich die Power bei bekannter RSD% der Labore für das ISPE-Design ermitteln lässt [Abb. 4.2-2 in 26]. Ferner wurde ein daraus abgeleitetes Diagramm vorgestellt, welches nicht nur für das ISPE-Design mit den starren Akzeptanzgrenzen von 2% gültig ist, sondern durch Einführung der relativen (prozentualen) Akzeptanzgrenzen (%AL) die Ermittlung der Power für jede gewünschte Akzeptanzgrenze ermöglicht [Abb. 6-6. entspr. Abb. 4.2-3. in 26]. In die %AL fließt der Standardfehler $\hat{\sigma}_{\bar{x}}$, der bekannt sein muss und die gewünschte AL ein (Gl. 35).

$$\%AL = \frac{\hat{\sigma}_{\bar{x}} \cdot 100\%}{AL} \quad (Gl. 35)$$

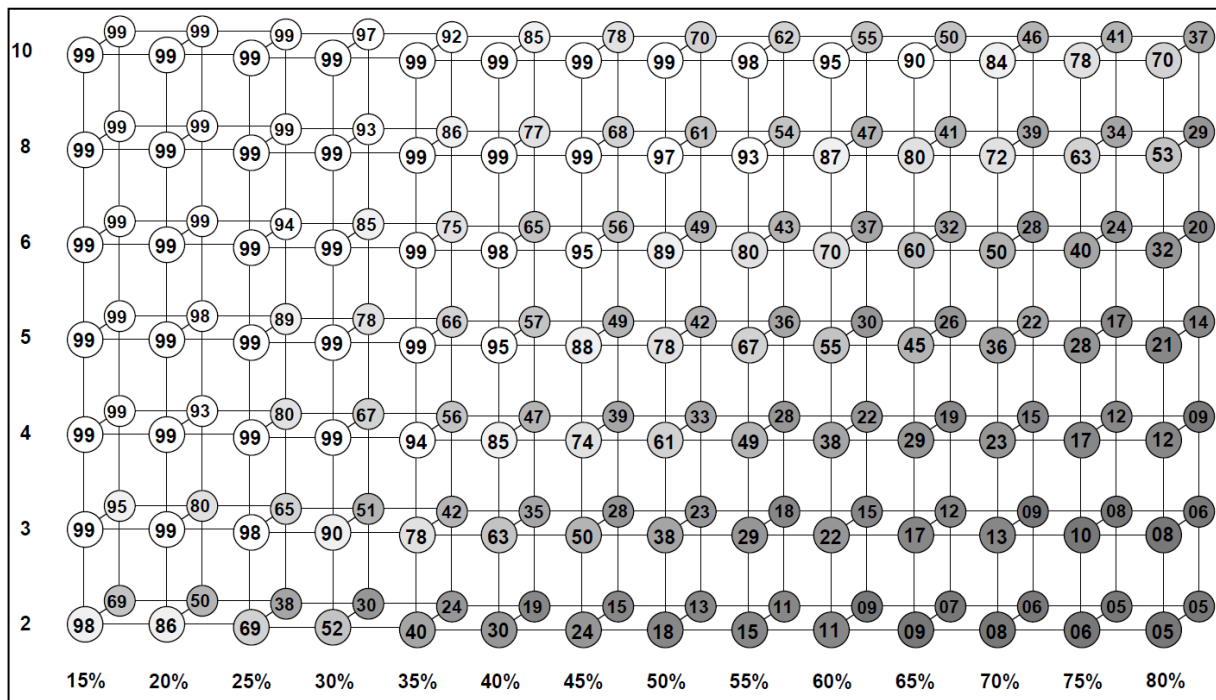


Abb. 6-6.: Dargestellt sind die $(1-\beta)$ Power-Werte in Abhängigkeit von dem tatsächlichen Bias. In der vorderen Ebene beträgt dieser 0, während die hinteren Ebene einem Bias von der Hälfte der Akzeptanzgrenze entspricht. Auf der Abszisse sind die %AL aufgetragen, auf der Ordinate die Anzahl der Analysten bzw. der Serien. (entlehnt aus [26] Abb. 4.2-3).

6.3.3. Anwendung der %AL im erweiterten ISPE Konzept

Durch den Einsatz der frei wählbaren Akzeptanzkriterien ist die Bestimmung der Power mithilfe von Abb. 6-6. besonders gut für das erweiterte ISPE-Konzept mit den -wenn möglich- weniger strikten und skalierten AL geeignet.

An einem Szenario soll noch einmal der Unterschied zwischen dem klassischen und dem erweiterten ISPE-Konzept erläutert werden. In diesem Szenario dient erneut die Methode aus Abschnitt 6.1 für die Transfersituation.

Für $\hat{\sigma}_{\bar{x}}$ sei beispielhaft 0,62 angenommen, was bei einem auf 100% gesetzten Mittelwert auch 0,62% RSD entspräche. Im klassischen Design [Abb. 4.2-2 in 26] ergibt sich beim Einsatz von 2 Analysten ein Risiko von 50% einen erfolgreichen Methodentransfer zu verwerfen, sogar wenn der Bias bei 0 läge. Erhöht man die Anzahl der Analysten auf drei, so ergibt sich ein durchaus akzeptables Risiko von nur 12%, allerdings weiterhin bei einem Bias von 0. Ein Bias von 0 ist allerdings recht unwahrscheinlich. Wahrscheinlicher bei den Akzeptanzgrenzen von 2% wäre ein Bias von etwa 1%, wobei dann das Risiko wieder auf 51% stiege.

Im erweiterten Konzept werden die Grenzen nach den Überlegungen aus Abschnitt 6.3.1. auf 3% ($3\% < 5\%$) gesetzt. Dieser Wert wiederum kann noch mit 1,15 skaliert

werden, was zu einer AL von 3,45% führt. Aus Gleichung 35 ergibt sich dann ein %AL von 17,97%. In Abbildung 6-6. ist dieser Wert nicht dezidiert aufgeführt, dennoch kann man die Power gut abschätzen. Sie liegt zwischen 98% (%AL = 15) und 86% (%AL = 20), wenn zwei Analysten pro Labor bei einem Bias von 0 arbeiten würden. Bei einem Bias, welcher der Hälfte der Akzeptanzgrenze entspräche (hintere Ebene in Abb. 6-6.), sinkt die Power natürlich, kann aber durch einen 3 Analysten wieder auf ein akzeptables Niveau angehoben werden.

In dieser Transfersituation sind also bei Anwendung des erweiterten Konzepts -selbst bei einem wahrscheinlichen Bias- 3 Analysten pro Labor ausreichend. Bei Anwendung des klassischen Designs ist dies jedoch nicht der Fall. Das erweiterte Design kann also den Arbeitsaufwand und die Kosten bei Transfers erheblich reduzieren.

6.3.4. Anwendung des erweiterten ISPE-Konzepts

Das beschriebene erweiterte ISPE-Konzept kann wie folgt auf eigene Transfersituationen angewendet werden.

1. Auswahl der durch die Methode vorgegeben Akzeptanzgrenzen und Skalierung dieser mit 1,15 (s. Abschnitt 6.3.1.).
2. Ermittlung des Gesamtfehlers der Labore $\hat{\sigma}_x$. Am besten dafür geeignet ist die Auswertung von Langzeitdaten aus Regelkarten, falls nicht möglich die Schätzung aus der Wiederholpräzision [120 und die dort zitierte Literatur].
3. Berechnung der relativen Akzeptanzgrenzen (%AL) nach Gleichung 35.
4. Auswahl eines Designs aus Abb. 6-6., welcher ausreichende Power (mind. 80%) garantiert.
5. Berechnung eines Konfidenzintervalls für θ nach Gleichung 31a und b.
6. Vergleich des Konfidenzintervalls mit dem Intervall der Relevanz:
 - a. Liegt es komplett drin, wurde der Methodentransfer erfolgreich beendet.
 - b. Liegt es nicht komplett drin, müssen die Annahmen, insbesondere die Schätzung des Gesamtfehlers überdacht werden. Anschließend wieder bei Punkt 3. weitermachen.

6.4. Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurde kurz wiederholt, warum bei dem Transfer von analytischen Methoden der klassische zweiseitige-t-Test nicht zum Nachweis eines erfolgreichen

Transfers ausreicht. Es wurde gezeigt, für diesen Zweck der Einsatz von Äquivalenztests besser geeignet ist. Diese werden auch von der ISPE in ihrem Leitfaden für Methodentransfers genutzt, welcher allgemein sehr gut angenommen worden ist, da ansonsten keine offiziellen Vorgaben und Richtlinien zu diesem komplexen Thema existieren. Die großen Möglichkeiten des fortschrittlichen Konzepts der ISPE werden jedoch durch den Einsatz von starren Akzeptanzgrenzen ($\pm 2\%$) stark eingeschränkt. Schepers et al. konnten zeigen, dass durch diese festen Akzeptanzgrenzen der Gesamtfehler $\hat{\sigma}_{\bar{x}}$ nicht größer als 0,6% RSD sein darf, weil ansonsten das Risiko einen erfolgreichen Transfer abzulehnen sehr groß wird.

Aus diesem Grund wurde in diesem Kapitel eine Erweiterung für das ISPE Konzept vorgestellt. Als erstes wurde gezeigt, dass die Testcharakteristik der Äquivalenztests eine Aufweitung der Akzeptanzgrenzen bis an die Toleranzgrenzen der jeweiligen Methode und danach sogar eine Skalierung mit 1,15 ermöglicht. Die auf diese Weise nicht unnötig strikt gehaltenen Akzeptanzgrenzen senken das erwähnte Risiko beträchtlich. Ferner wurde dargestellt, dass die von Schepers et al. eingeführten relativen Akzeptanzgrenzen die Auswahl eines Designs mit ausreichender Power erleichtern und in Verbindung mit den aufgeweiteten Akzeptanzgrenzen zu einer deutlichen Reduktion von Arbeitsaufwand und Kosten bei gleichbleibender Datensicherheit führen.

7. Zusammenfassung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Aspekte eines wirtschaftlichen und effizienten Einsatzes der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie untersucht. Dabei stand die Fragestellung im Vordergrund, wie bestehende Abläufe bei der täglichen Nutzung von HPLC-Methoden und der regelmäßigen Wartung der HPLC-Anlagen schneller, effizienter und damit kostengünstiger und wirtschaftlicher gestaltet werden können, ohne dabei auf hohe Datenqualität verzichten zu müssen.

Eine Zeitersparnis in der Analytik bringt immer auch eine Kostenersparnis mit sich. Im kleinen Labormaßstab, etwa an einer Universität, ist diese Ersparnis nur gering, weil die Analysenserien meist recht kurz sind, so dass sich kaum Vorteile durch eine schnellere Analyse ergeben. In der pharmazeutischen Industrie jedoch sind die Analysenserien üblicherweise lang und werden täglich durchgeführt. In diesen Fällen summiert sich selbst eine Verkürzung der Zeit von nur einer Minute pro Analyse zu einem immensen Kostenvorteil, wenn man berücksichtigt, dass in der gewonnenen Zeit die Instrumente und das Personal anderweitig eingesetzt werden können. Nicht zuletzt werden auch weniger der teuren Chemikalien und Reagenzien verbraucht.

Im Bereich der HPLC gibt es daher seit einigen Jahren den Trend zu einer sogenannten schnellen HPLC, mit der sich die Analysenzeiten gegenüber der klassischen HPLC um bis zu 90% reduzieren lassen. Eine Möglichkeit für schnelle HPLC bieten die nicht partikelbasierten monolithischen Säulen. Ihre bimodale Struktur aus Makro- und Mesoporen ermöglicht sehr hohe Flussraten (im analytischen Maßstab bis 9,9 ml/min), ohne dass dabei der Maximaldruck der Pumpe erreicht wird und ohne signifikante Verschlechterung der Trennleistung. Einen weiteren Geschwindigkeitsvorteil bietet bei dem Einsatz von Monolithen das Flussratenprogramm. Es wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass seine Auswirkungen auf die Analysenzeit und Selektivität durchaus mit denen der Gradientenelution in der klassischen HPLC vergleichbar sind, jedoch nicht die Nachteile einer langen Equilibrierung mit sich bringen. Die Untersuchungen haben bestätigt, dass ein Flussratenprogramm weder die Präzision der Retentionszeiten, noch die der Peakflächen nachteilig beeinflusst.

Die Monolithen sind noch aus einem anderen Grund wirtschaftlich interessant. Sie benötigen kein neues und teures Equipment, sondern können theoretisch an vorhandene, klassische HPLC-Anlagen angeschlossen werden. Hier ist dennoch Vorsicht geboten, da gezeigt werden konnte, dass es insbesondere bei älteren Pumpensystemen zu Abweichungen bei hohen Flussraten kommen kann, die außerhalb des Toleranzbereiches von $\pm 3\%$ liegen. Auch ältere Detektoren mit zu geringen Datenaufnahmeraten könnten schnell eluierende Substanzen möglicherweise nicht richtig erfassen, weshalb darauf geachtet werden muss, dass der Detektor eine Datenaufnahmerate von mindestens 10Hz und mehr besitzt.

Grundsätzlich kann also der Einsatz von Monolithen in Verbindung mit dem Flussratenprogramm die Analysenzeiten signifikant verkürzen, ohne dabei die Trennleistung und die Präzision zu beeinträchtigen. Die Nutzung von älterem HPLC-Equipment ist prinzipiell möglich, wenngleich auf eine entsprechende Qualifizierung des Pumpensystems und des Detektors geachtet werden muss. Die Kostenersparnis beruht hier hauptsächlich auf der deutlichen Reduktion der Analysenzeit und nicht auf der Einsparung von Chemikalien.

Einen enormen wirtschaftlichen Faktor im Bereich der HPLC stellt die regelmäßige Qualifizierung, also der dokumentierte Nachweis einer einwandfreien Funktion, der HPLC-Geräte dar. Diese muss in regelmäßigen Abständen erfolgen, damit stets gewährleistet ist, dass ein Gerät innerhalb vorherbestimmter Spezifikationen arbeitet und somit richtige Ergebnisse liefert. Während der Qualifizierungsphase, die üblicherweise halbjährlich oder einmal pro Jahr durchgeführt wird, sind die betroffenen Geräte offline und können nicht für Analysen verwendet werden. Dieser Nutzungsausfall und das für die Qualifizierung eingesetzte Personal stellen die direkten Kosten der Qualifizierung dar. Gravierender sind aber die versteckten Kosten, die erst auftreten, wenn ein Gerät die Requalifizierung nicht besteht. Dann nämlich müssen alle Daten des letzten Halbjahres bzw. Jahres neu evaluiert werden und eventuell ganze Chargen zurückgerufen werden.

In dieser Arbeit wurde ein innovatives Konzept vorgestellt, welches die direkten Kosten minimiert und die indirekten vermeidet, indem durch kontinuierliche Überwachung kritischer Systemparameter ein Fehler sofort erkannt wird. Für diese kontinuierliche Leistungsqualifizierung (kontinuierliche PQ) werden Daten von erweiterten Systemeignungstests der Routinemethoden im Laboralltag genutzt. Dafür

wurden aus einer großen Anzahl möglicher Prüfparameter 12 kritische Systemparameter empirisch ermittelt. Diese müssen auf jeden Fall überprüft werden, um valide Rückschlüsse auf die Funktionstüchtigkeit des HPLC-Gerätes ziehen zu können. Ferner wurde statistisch bewiesen, dass Daten, die im Laboralltag während eines Systemeignungstests erhoben werden, qualitativ mindestens gleichwertig den Daten sind, die während der Qualifizierung mit speziellen PQ-Methoden anfallen. Diese Informationen können also tatsächlich für die Evaluierung der Systemparameter herangezogen werden. Da klassische Systemeignungstests (SST) üblicherweise nicht alle benötigten Daten liefern, müssen sie leicht erweitert werden, um für das Konzept der kontinuierlichen PQ genutzt werden zu können. Dieser größere Arbeitsaufwand rechnet sich jedoch schnell, wenn man bedenkt, dass das neue Konzept die periodischen PQ-Testungen im Idealfall ersetzt und somit die damit verbundenen direkten und indirekten Kosten vermieden werden. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass nicht jeder SST für das neue Konzept geeignet ist. In diesem Fall muss auf die klassische PQ zurückgegriffen werden.

Das neue Konzept der kontinuierlichen Leistungsqualifizierung ist also der klassischen PQ überlegen, da es die hohen Kosten vermeidet und zudem durch eine ständige Überwachung der Systemleistung eine deutlich höhere Datensicherheit ermöglicht. Für die Implementierung im Labor muss lediglich sichergestellt werden, dass mindestens eine der genutzten Methoden auch einen geeigneten SST besitzt.

Ein weiterer Aspekt der wirtschaftlichen Nutzung der HPLC ist ihr Einsatz in analytischen Bereichen, in dem sie mit kostenintensiveren Methoden konkurrieren kann. In dieser Arbeit wurde dies anhand der Proteinanalytik demonstriert. Für die Bestimmung von Molmassen und die Bestimmung der Molmassenverteilung wird die HPLC als HP-SEC seit längerer Zeit benutzt. Doch seit Aufkommen von proteinbasierten Pharmazeutika, ist der Bedarf nach einer umfassenden Charakterisierung, zu der auch eine präzise Quantifizierung gehört, gestiegen. Dafür werden zurzeit sowohl UV-spektrometrische Methoden, mit denen allerdings nur der Gesamtproteingehalt bestimmbar ist, als auch elektrophoretische Methoden, die zum Teil aber eine nicht ausreichend hohe Präzision bieten, genutzt. Neuerdings werden für die Proteinanalytik vermehrt massenspektrometrische Methoden genutzt. Diese haben aber einen sehr hohen Preis/Analyse-Wert und sind in der Probenaufbereitung aufwändig.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die HP-SEC nicht nur für eine Molmassenbestimmung, sondern durchaus auch für eine Quantifizierung von Proteinen geeignet ist. Sowohl die Präzision der Elutionsvolumina, als auch die der Peakflächen bewegen sich bei der HP-SEC in den Größenordnungen der RP-HPLC. Eine Herausforderung stellte die Trennung der Proteine vor der Quantifizierung dar, da die Selektivität der HP-SEC, aufgrund des Trennmechanismus, schlecht ist und die einzelnen Analyten bei ungenügender Massendifferenz in Form nicht vollständig aufgelöster Peaks eluieren. Es konnte gezeigt werden, dass gängige rechnerische Verfahren, wegen der bei Proteinen häufig auftauchenden Nebenpeaks, zu nicht richtigen Ergebnissen führen würden. Als Lösung wurde schließlich die nicht ideale SEC (nSEC) präsentiert, bei der gezielt Wechselwirkungen zwischen den Proteinen und der stationären Phase verursacht werden. Auf diese Weise lassen sich die Kapazitätsfaktoren der einzelnen Analyten manipulieren und somit eine Basislinientrennung erreichen. Die anschließende Quantifizierung über die Peakflächen ist aufgrund der guten Präzision unproblematisch.

Die HP-SEC stellt also eine sehr gute Methode zur Charakterisierung von Proteinen in der pharmazeutischen Analytik dar. Im idealen SEC-Modus können Molmassen und ihre Verteilung einfach bestimmt werden und im nSEC-Modus ist eine präzise Quantifizierung möglich. Dazu ist diese Technik sehr kostengünstig, da auf vorhandenes HPLC-Equipment zurückgegriffen wird und als mobile Phasen nur wässrige Puffer benutzt werden. Lediglich eine SEC-Säule muss angeschafft werden, die aber sowohl für den SEC-, als auch für den nSEC-Modus verwendet wird. Um zwischen den beiden Modi zu wechseln sind keine apparativen Veränderungen nötig, es werden nur die Ionenstärke und der pH-Wert der mobilen Phase verändert. Dies ist zugleich auch die Schwäche der nSEC. Wegen der sehr unterschiedlichen Eigenschaften verschiedener Proteine, müssen für jedes Trennproblem die dafür besten nicht idealen Bedingungen ermittelt werden, was die Methodenentwicklung bei dieser Technik verlängert. Dieser Aufwand lohnt sich aber, denn wenn eine Methode erst einmal entwickelt und validiert wurde, können die Analysen schnell und sehr kostengünstig durchgeführt werden.

Im letzten Kapitel dieser Arbeit wurde am Beispiel der HPLC darauf eingegangen, wie die Kosten und der Arbeitsaufwand eines Methodentransfers durch Einsatz von Äquivalenztests und die Auswahl eines geeigneten Transferdesigns reduziert werden

können. Dafür wurde die Herangehensweise der International Society of Pharmaceutical Engineering (ISPE) an den Methodentransfer und die Ermittlung eines Transferdesigns mit ausreichend hoher Power ($1 - \beta$) für ein gegebenes Szenario vorgestellt. Dieses Konzept wurde um einen Skalierungsfaktor erweitert, welcher es erlaubt, die aus t-Tests stammenden Akzeptanzgrenzen um 30% aufzuweiten. Mithilfe dieses erweiterten ISPE-Konzepts können Methodentransfers mit maximaler Power durchgeführt werden, was die Wahrscheinlichkeit maximiert korrekte Transfers wirklich anzunehmen. Zugleich kann die kleinste, dafür benötigte Anzahl an Analysten und Testungen bestimmt werden, was einen geringeren Arbeits- und Zeitaufwand bedeutet.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Hochleistungsflüssigchromatographie eine seit langer Zeit bewährte Analysentechnik ist und dennoch ein Potenzial für Zeit- und Kosteneinsparungen bei der täglichen Nutzung bietet.

8. Experimenteller Teil

8.1. Instrumentierung und Software

Sowohl für die Untersuchungen zur schnellen HPLC, für den Teil der Qualifizierung Analytischer Instrumente, als auch für die Größenausschlußexperimente wurden zwei HPLC-Analgen (Gerät 1 und 2) der Firma Merck-Hitachi® verwendet. Die Anlagen bestanden aus folgenden Bauteilen:

Gerät 1:

- Pumpe (Modell L-6200A)
- Manueller Injektor (Modell Rheodyne 7125)
- Probengeber (Autosampler) (Modell 2000A)
- Dioden-Array-Detektor (Modell L-7450)
- Schnittstellenmodul (Interface) (Modell D-6000)
- Säulenofen (T1, von der Firma TechLabs aus Erkerode, Deutschland)

Gerät 2:

- Pumpe (Modell L-6200A)
- Manueller Injektor (Modell Rheodyne 7125)
- Probengeber (Autosampler) (Modell 2000A)
- UV/VIS Detektor (Modell L-4250)
- Schnittstellenmodul (Interface) (Modell D-6000)

Für die Aufnahme und Auswertung der Daten wurde auf beiden Geräten die Software „HPLC System Manager“ der Firma Merck-Hitachi® (Modell D-7000, Version 3.1.1.) verwendet.

Ein Teil der Größenausschlußexperimente, insbesondere die zur nSEC wurden mit einer Elite LaChrom HPLC-Anlage der Firma VWR® durchgeführt. Diese bestand aus folgenden Bauteilen:

Elite LaChrom:

- Pumpe (Modell L-2130)

- Probengeber (Autosampler) (Modell 2200)
- UV/VIS Detektor (Modell L-2400)
- Schnittstellenmodul (Organizer) (keine Modellbezeichnung)

Die zur Aufnahme und Auswertung der Daten genutzte Software war die „EZChrom Elite Software“ der Firma VWR® (Version 3.2.1., Build 3.2.1.31)

Für die statistischen Auswertungen in allen drei Kapiteln wurden verschiedene Versionen (2003, 2010beta, 2010) der Software Excel® von der Firma Microsoft® verwendet.

Alle Peakflächen, die bei den HPLC-Experimenten erhalten wurden, sind auf die tatsächliche Einwaage normiert worden, um sie vergleichbar zu machen. Dazu wurden die Peakflächen durch die dazugehörige genaue Einwaage dividiert, sodass kleine Ungenauigkeiten bei der Einwaage keinen Einfluss auf die Ergebnisse hatten. Diese Vorgehensweise ist nur im linearen Arbeitsbereich des Detektors erlaubt.

8.1.1. verwendete HPLC-Säulen

8.1.1.1. schnelle HPLC und AIQ

Für die Experimente zum Flussratenprogramm mit monolithischen Phasen und für die AIQ-Experimente wurden Chromolith® Performance RP-18e Säulen (100 · 4,6 mm) von der Firma Merck® verwendet. Die Füllung der Säule bestand aus einem mit Octadecylsilylchlorid und Trimethylsilylchlorid modifiziertem Kieselgel.

Für die Überprüfung des Pumpensystems in Kapitel 4.4.2.2. wurden eine gepackte RP-18 Säule (LiChroCART® 125-4 LiChrospher® 100 RP-18, 5 µm) der Firma Merck® verwendet.

8.1.1.2. SEC und nSEC

Für die SEC- und nSEC-Experimente wurde eine GFC-Säule (PSS-Proteema: 8,0 · 300mm, 300Å, 5µm) samt Vorsäule (PSS-Proteema: 8,0 · 50mm, 5µm) der Firma Polymer Standard Service GmbH verwendet. Die Vorsäule war mit festen Partikeln von 5µm Durchmesser gefüllt. Die Partikel der GFC Säule hatten eine durchschnittliche Porengröße von 300Å. Die genaue Beschaffenheit der Partikel wird

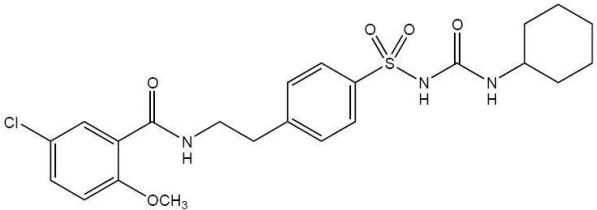
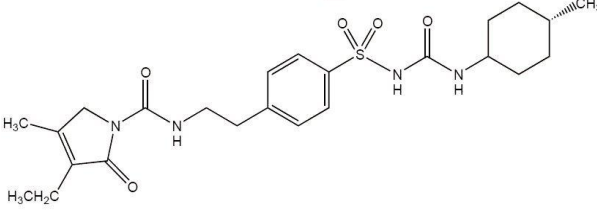
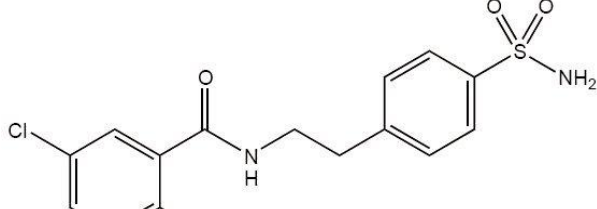
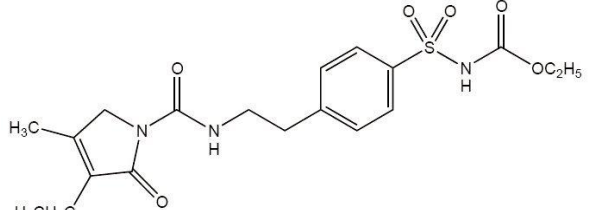
vom Hersteller nicht angegeben. Bekannt ist nur, dass sie auf Basis von Kieselgel hergestellt werden. Die Säule soll einen Molekülmassenbereich von 1 kDa bis 1000 kDa abdecken.

8.2. Flussratenprogramm in der schnellen HPLC

8.2.1. Chemikalien und Reagenzien

Für die Herstellung der Lösungsmittel für die Proben und für die Herstellung der mobilen Phase wurde Acetonitril in HPLC-Qualität (bezogen von Acros Organics und Sigma Aldrich) verwendet. Bei den Testsubstanzen handelte es sich um die oralen Antidiabetika Glibenclamid und Glimepirid sowie um ein Abbauprodukt (a) von Glibenclamid und ein Abbauprodukt (b) von Glimepirid [Tab. 8-1.]. Die Testsubstanzen wurden von Sanofi Aventis aus Frankfurt am Main bezogen.

Tab. 8-1.:

INN	IUPAC Name	Struktur
Glibenclamid	1-[[4-[2-[(5-Chlor-2-methoxybenzoyl)amino]ethyl]phenyl]sulfonyl]-3-cyclohexylharnstoff	
Glimepirid	1-[[4-[2-(3-Ethyl-4-methyl-2-oxo-3-pyrrolin-1-carboxamido)ethyl]phenyl]sulfonyl]-3-trans-(4-methylcyclohexyl)harnstoff	
N.N. (Abbauprodukt a)	5-chlor-2-methoxy-N-[2-(4-sulfamoylphenyl)ethyl]benzamid	
N.N. (Abbauprodukt b)	1-[[4-[2-[[3-Ethyl-4-methyl-2-oxo-2,3-dihydro-1H-pyrrol-1-yl]carbonyl]amino]ethyl]phenyl]sulfonyl]-3-(cis-4-methylcyclohexyl)harnstoff	

Die für die Puffer verwendeten Chemikalien waren: Kaliumdihydrogenphosphat, Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat, Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat und Phosphorsäure ($w = 85\%$). Diese Chemikalien wurden von Riedel-de-Haën aus Seelze (Deutschland) bezogen. Für alle wässrigen Zubereitungen wurde demineralisiertes Wasser benutzt.

8.2.2. Chromatographischen Bedingungen

Die mobile Phase wurde in Anlehnung an frühere Arbeiten [87, 127] hergestellt. Dazu wurden 1,182 g Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat in 1000g Wasser gelöst und der pH -Wert wurde anschließend mit Phosphorsäure auf $pH = 3$ eingestellt. Dieser Puffer wurde mit Acetonitril in einem Verhältnis von 55% zu 45% (v/v) gemischt. Die Wellenlänge des DAD bzw. UV/VIS Detektors wurde für alle Messungen auf 228 nm eingestellt und die Datenaufnahmerate betrug 10Hz. Die Trennungen erfolgten bei 30°C (Einstellung am Säulenofen). Das Injektionsvolumen für jeden Lauf betrug 10 μ l. Zur Anwendung kam das in Abschnitt 3.3.2.1. beschriebene Flussratenprogramm [Tab. 3-1.].

8.2.3. Lösungsmittel für die Proben

Das Lösungsmittel in dem die Proben gelöst wurden bestand aus einem Phosphatpuffer $pH = 7,4$ ($c = 4$ mmol/L) und Acetonitril gemischt in einem Verhältnis von 20% zu 80% (v/v). Der Puffer wurde nach Anweisung der Britischen Pharmakopöe [128] hergestellt, indem 21,20 mg Kaliumdihydrogenphosphat und 34,65 mg Dinatriumhydrogenphosphat mit Wasser zu 100,0 ml gelöst wurden.

8.2.4. Probenvorbereitung

Die Probe bestand aus den vier unter 8.2.1. erwähnten Testsubstanzen, die in dem Lösungsmittel aus 8.2.3. gelöst wurden. Die Massenkonzentration der beiden APIs betrug jeweils 0,2 mg/ml. Die Massenkonzentration der Abbauprodukte betrug jeweils 0,1 mg/ml.

8.3. AIQ

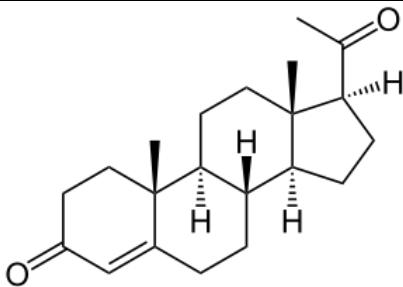
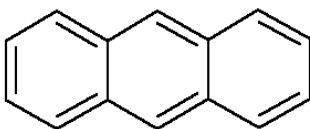
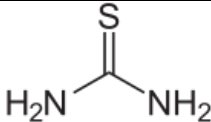
8.3.1. Chemikalien und Reagenzien

Für Acetonitril und die zur Pufferherstellung benötigten Chemikalien gilt dasselbe, wie unter 8.2.1.

8.3.1.1. PQ-Methode

Die für die PQ-Methode verwendeten Substanzen waren Progesteron und Anthracen [Tab. 8-2.]. Thioharnstoff diente in dem Gemisch lediglich als Marker für die Totzeit, da es nicht mit der stationären Phase interagiert und zusammen mit der Totzeit eluiert. Alle Substanzen wurden von Sigma-Aldrich bezogen.

Tab. 8-2.:

INN	IUPAC Name	Struktur
Progesteron	Pregn-4-en-3,20-dion	
N.N.	Anthracen	
Thioharnstoff	Sulfocarbamid	

8.3.1.2. Routinemethode

Bei den für die Routinemethode verwendeten Substanzen handelt es sich um dieselben vier wie unter 8.2.1. beschrieben.

8.3.2. Chromatographischen Bedingungen**8.3.2.1. PQ-Methode**

Die mobile Phase bestand aus Acetonitril und Wasser, gemischt in einem Verhältnis von 60% zu 40% (v/v). Die Wellenlänge des DAD bzw. UV/VIS Detektors wurde für alle Messungen auf 254 nm eingestellt und die Trennungen erfolgten bei Raumtemperatur. Das Injektionsvolumen für jeden Lauf betrug 10 µl.

8.3.2.2. Routinemethode

siehe Abschnitt 8.2.2.

8.3.3. Lösungsmittel für die Proben

Die Testsubstanzen der PQ-Methode wurden in mobiler Phase (s. 8.3.2.1.) gelöst. Für die Routinemethode siehe Abschnitt 8.2.3.

8.3.4. Probenvorbereitung

8.3.4.1. PQ-Methode

Die drei Testsubstanzen aus 8.3.1.1. wurden in mobiler Phase gelöst. Die Massenkonzentrationen von Thioharnstoff und Anthracen betrugen jeweils 10 µg/ml. Die Massenkonzentration von Progesteron betrug 100 µg/ml.

8.3.4.2. Routinemethode

siehe Abschnitt 8.2.4.

8.3.5. Standards zur Bestimmung der Detektorlinearität

Für die Bestimmung der Linearität der Detektorantwort wurde Coffein in Wasser gelöst. Die Massenkonzentration betrug 200 µg/ml. Davon ausgehend wurden die folgenden Massenkonzentrationen durch entsprechendes Verdünnen erhalten: 10 µg/ml ; 50 µg/ml ; 100 µg/ml ; 150 µg/ml. Gemessen wurde bei einer Wellenlänge von 272 nm und einem Injektionsvolumen von 10 µl.

8.3.6. Daten von Kooperationspartnern

Die SST- und PQ-Daten für die Ausweitung des Pilotprojekts sind von Abbott GmbH & Co. KG, 67061 Ludwigshafen, Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, 65926 Frankfurt am Main, Nycomed GmbH, Byk-Gulden-Strasse 2, 78467 Konstanz, W. Spitzner Arzneimittelfabrik GmbH, 76227 Karlsruhe, LAZ GmbH & Co. KG, Dischingerweg 15, 72070 Tübingen, Vetter Pharma-Fertigung GmbH & Co. KG, 88212 Ravensburg und Schaper & Brümmer GmbH & Co. KG, Bahnhofstraße 35, 38259 Salzgitter zur Verfügung gestellt worden.

8.4. Quantitative SEC

8.4.1. Chemikalien und Reagenzien

Die für die SEC und nSEC-Versuche verwendeten Proteine wurden in p.a. Qualität (Reinheit > 99,8%) von Sigma Aldrich® bezogen. Die getesteten Proteine waren Ovalbumin, Myoglobin und β-Casein [Tab. 8-3.]. Das in Abschnitt 5.2.2. verwendete Polycystein wurde im Rahmen einer Testreihe von dem Institut für Pharmazeutische

Technologie der Technischen Universität Braunschweig synthetisiert. Das für die Bestimmung von V_t benutzte Natriumazid wurde von Riedel-de-Haën aus Seelze (Deutschland) bezogen.

Tab. 8-3.: Die Aminosäuresequenzen wurden aus [129] übernommen. Die molaren Massen beziehen sich jeweils auf das Monomer.

Protein	M_r	Aminosäuresequenz
Ovalbumin aus dem Hühnerei	44 kDa	MGSIGAASMEFCFDVFKELKVHHANENIFYCPIAAMSALAMVYLGAkdSTRtQI NKVVRFDKLPgFGDSIEAQCGTSVNVHSSLRDILNQITKPNdVYsFSLASRLYA EERYpILPEYLQCVKELYRGGLEPINFQTAAADQARELINSWVESQTNGIIRNVLQ PSSVDSQTAMVLVNAIVFKGLWEKAFKDEDtQAMPFRVTEQESKpVQMMYQI GLFRVASMASEKMKILELPFASGTMSMLVLLPDEVSGLEQLESINFEKLTEWT SSNVMEERKIKVYLPRMKMEEKYNLTsvLMAMGITdVfSSsANLsgISSAESLK ISQAVHAAHAEINEAGREVVGSAEAGVDAASVSEEFRAHDFLFCIKHIAtnAV LFFGRCVSP
Myoglobin aus dem Pferdeherz	17 kDa	MGLSDGEWQQVLNwGKVEADIAGHGQEVlRlFTGHpETLEKfDKfKHLKE AEMKASEDLKKHGTvVLTALGGILKKKGHAEELKPLAQSHATKHKIPIKYLEFI SDAIHVLHskHPGDFGADAQGAMTKALELFRNDIAAKYKELGFQg
β -Casein aus der Kuhmilch	24,1 kDa	MKVLILACLVALALARELEELNVPGEIVESLSsSEESITRINKKIEKFQSEEQQT EDELQDKIHpfAQTSQSLVYPFGPIPNsLPQNIPLtQTPVVVPPFLQPEVMGV SKVKEAMAPKHkEMPFKYpVEPFTEsQSLTLTDVENLHLPLlQsWMHQP HQPLPPTVMFPpQSVLSLSQSKVLPVPQKAVPYPQRDMPIQAFLLYQEPVLGP VRGPFPIIV

Für die Herstellung der SEC und nSEC Puffer wurden folgende Chemikalien verwendet: Arginin, Natriumchlorid, Natriumhydroxid, Kaliumdihydrogenphosphat, Dinatriumhydrogenphosphat, Phosphorsäure ($w = 85\%$) und Salzsäure ($w = 37\%$). Das Arginin wurde von Sigma-Aldrich[®], die restlichen Chemikalien von Riedel-de-Haën aus Seelze (Deutschland) bezogen. Zur Herstellung aller Puffer wurde demineralisiertes Wasser verwendet.

8.4.2. Chromatographischen Bedingungen

Bei der Größenausschlußchromatographie (Gelfiltration) dienten sowohl im idealen, als auch im nicht idealen Modus ausschließlich wässrige Puffer als mobile Phase.

8.4.2.1. SEC-Experimente

Der für die Untersuchungen verwendete Phosphatpuffer ($pH = 6,6$) wurde hergestellt, indem 250,0 ml Kaliumhydrogenphosphat-Lösung ($c = 0,2 \text{ mol/L}$), 89,0 ml Natriumhydroxid-Lösung ($c = 0,2 \text{ mol/L}$) und 17,532 g NaCl (= 0,3 Mol) mit Wasser zu 1000,0 ml verdünnt worden sind. Während der Untersuchungen der V_e - und AUC-Präzision wurde die Ionenstärke des Phosphatpuffers gesenkt indem die NaCl-Einwaage um jeweils 2,922 g (= 0,05 Mol) reduziert wurde. Der pH -Wert wurde entweder mit Phosphorsäure oder Natriumhydroxid-Lösung eingestellt.

Der Puffer nach Ejima et al. wurde analog hergestellt, jedoch wurden 34,84 g Arginin (= 0,2 Mol) anstatt des NaCl eingewogen und der pH der Lösung wurde mit Salzsäure eingestellt.

Das Injektionsvolumen betrug jeweils 20 µl und es wurde bei 214nm detektiert. Die Flussrate war konstant bei 1,000 ml/min.

8.4.2.2. nSEC-Experimente

Der für die nSEC-Untersuchungen verwendete Phosphatpuffer (pH = 6,3) wurde hergestellt, indem 2,181 g Kaliumdihydrogenphosphat (wasserfrei) (= 0,016025 Mol), 0,992 g Dinatriumhydrogenphosphat (wasserfrei) (= 0,006981 Mol) und 8,2 g NaCl (= 0,14031 Mol) mit Wasser zu 1000,0 ml gelöst wurden. Der resultierende pH-Wert wurde mit Phosphorsäure auf 6,3 eingestellt. Die Ionenstärke dieser Lösung betrug 0,1759 mol/L. Zur Reduzierung der Ionenstärke wurde der Puffer mit Wasser in einem Verhältnis von 1:10 verdünnt. Nach Einstellung des pH-Wertes auf 6,3 hatte diese Lösung eine Gesamtionenstärke von 0,0175 mol/L.

Die Detektionswellenlänge betrug 214nm bei einer konstanten Flussrate von 1,000 ml/min.

8.4.3. Lösungsmittel für die Proben

Bei allen SEC und nSEC-Experimenten wurden die Proben in der jeweiligen mobilen Phase gelöst.

8.4.4. Probenvorbereitung

8.4.4.1. SEC-Experimente

Es wurden von jedem Protein 100 mg genau eingewogen (Die tatsächlichen Einwaagen wurden auf 100,0 mg normiert) und mit mobiler Phase zu 100,0 ml aufgefüllt. Die Lösung wurde kurz im Ultraschallbad behandelt. Aus dieser Stammlösung ($\beta = 1,0 \text{ g/L} = 1,0 \text{ mg/ml}$) wurden die niedriger konzentrierten Probelösungen durch Verdünnen hergestellt. Dafür wurden 10,0 ml der Stammlösung zu 25,0 ml mit mobiler Phase aufgefüllt ($\beta = 0,4 \text{ g/L} = 0,4 \text{ mg/ml}$). 1,0 ml dieser Verdünnung wurden mit mobiler Phase zu 10,0 ml aufgefüllt ($\beta = 0,04 \text{ g/L} = 40 \text{ µg/ml}$). Für die LOQ Untersuchung wurde 1,0 ml der der Verdünnung ($\beta = 0,4 \text{ g/L}$) mit mobiler Phase zu 100,0 ml aufgefüllt ($\beta = 0,004 \text{ g/L} = 4,0 \text{ µg/ml}$).

Für die Experimente bei den alle Proteine gleichzeitig untersucht wurden, sind für die Stammlösung von allen jeweils 100 mg genau eingewogen worden.

Die Probelösungen wurden vor dem Vermessen durch einen Spritzenvorsatzfilter der Firma Carl Roth[®] (Rotilabo[®] „RC“, 45 µm Porengröße) filtriert.

8.4.4.2. nSEC-Experimente

Die Probenvorbereitung wurde wie unter 8.4.4.1. durchgeführt.

9. Literatur

- [1] M. Tswett, *O novoy kategorii adsorbtsionnykh yavleniy i o primenenii ikh k biokhimicheskomu analizu. (Eine neue Kategorie von Adsorptionphänomenen und deren Anwendung für die biochemische Analyse)*, Tr. Warszawsk. Obst. Jestesv. Otd. Biol. 14, 20–39, 1903
- [2] A. Martin, R. Synge, Nobelpreis, http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1952/
- [3] G. Rücker, M. Neugebauer, G. Willems, *Instrumentelle pharmazeutische Analytik: Lehrbuch zu spektroskopischen, chromatographischen und elektrochemischen Analysemethoden*, 4. Auflage der wissenschaftlichen Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 2008
- [4] S. El Deeb, *High Efficiency Separation Techniques: Fast HPLC Using Monolithic Silica Columns and Chiral Separation Using Capillary Zone Electrophoresis*, Dissertationschrift, Technische Universität Braunschweig, 2007
- [5] K. Cabrera et al., *A New Monolithic-Type HPLC Column For Fast Separations*, J. High Resol. Chromatogr., 23, (1) 93–99, 2000
- [6] K. Nakanishi et al., *Double Pore Silica Gel Monolith Applied to Liquid Chromatography*, Journal of Sol-Gel Science and Technology 8, 547–552 1997
- [7] N. Ishizuka et al., *Monolithic silica columns for high-efficiency separations by high-performance liquid chromatography*, J. Chromatogr. A 960, 85–96, 2002
- [8] M. Kele et al., *Repeatability and reproducibility of retention data and band profiles on six batches of monolithic columns*, J. Chromatogr. A 960, 19–49, 2002
- [9] USP, United States Pharmacopoeia 31 NF-28 S1 General Chapter <1058> *Analytical Instrument Qualification*, 2008
- [10] R.D. McDowell, *Why System Suitability Tests Are Not a Substitute for Analytical Instrument Qualification or Calibration (Part 1)*, LCGC Europe Volume 23, 7, 369–374, 2010
- [11] R.D. McDowell, *Why System Suitability Tests Are Not a Substitute for Analytical Instrument Qualification or Calibration (Part 2)*, LCGC Europe Volume 23, 11, 585–589, 2010

-
- [12] L. Kaminski, B. McDowell et al., *Why System Suitability Tests Are Not a Substitute for Analytical Instrument Qualification (Part 3): Performance Qualification*, LCGC Europe Volume 24, August 2011.
- [13] Ph.Eur., Europäisches Arzneibuch 6.4., *Monographien: Somatropin*, 2009
- [14] T. Otte, *Optimisation of ambient and high temperature asymmetric flow field-flow fractionation with dual/multi-angle light scattering and infrared/refractive index detection*, J. Chromatogr. A 1217, 722–730, 2010
- [15] G. Heinzmann et al., *Alginate, Chitosane und Xanthane – Charakterisierung von Nahrungsmittel-Zusatzstoffen und –Hilfsstoffen mit der GPC/SEC mit Dreifachdetektion*, <http://www.viscothek.de>
- [16] Ph.Eur., Europäisches Arzneibuch 6.4., *Kapitel 2.2.30, Ausschlusschromatographie*, 2009
- [17] M. Harris, *Monoclonal antibodies as therapeutic agents for cancer*, Lancet Oncol., 5, 292–302, 2004
- [18] A. Benjouad, *Antibody biotechnology*, Afr. J Biotechnol. 8, 13, 2911-2915, 2009
- [19] M. Tabrizi et al., *Biodistribution Mechanisms of Therapeutic Monoclonal Antibodies in Health and Disease*, The AAPS Journal, 12, 1, 33–43, 2010
- [20] N. Nicolaides et al., *Monoclonal Antibodies: A Morphing Landscape for Therapeutics*, Drug Dev. Res., 67, 781–789, 2006
- [21] Pipelinedrugs, <http://pipelinedrugs.com>
- [22] O. Lowry et al., *Protein Measurement With The Folin Phenol Reagent*, J. Biol. Chem. 193, 265–275, 1951
- [23] M. Bradford, *A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding*, Anal. Biochem. 72, 248-254, 1976
- [24] S. Schröder, *Präzision in der Gelelektrophorese für die Pharmazeutische Qualitätskontrolle*, Dissertationschrift, Technische Universität Braunschweig, 2009
- [25] Y. Hongping et al., *Qualitative and quantitative comparison of brand name and generic protein pharmaceuticals using isotope tags for relative and absolute quantification and matrix-assisted laser desorption/ionization tandem time-of-flight mass spectrometry*, Anal. Biochem., 400, 46–55, 2010
- [26] U. Schepers, *Statistische Beurteilung der Güte von analytischen Ergebnissen - Untersuchungen zur Präzision in der HPLC und Bewertung analytischer*
-

- Methodentransfers*, Dissertationschrift, Technische Universität Braunschweig, 2006
- [27] W.W. Hauck et al., *Acceptable, Equivalent, or Better: Approaches for Alternatives to Official Compendial Procedures*, Pharmacopeial Forum 35(3), 772–778, 2009
- [28] W.J. Westlake, *Use of confidence intervals in analysis of comparative bioavailability trials*, J. Pharm. Sci. 61, 1340–1341, 1972
- [29] ISPE: International Society for Pharmaceutical Engineering, *Technology transfer, ISPE Guide*, 23–34, 2003
- [30] V. Meyer, *Practical HPLC*, 4. Auflage im John Wiley and Sons Verlag, Canada, 2004
- [31] J. Dennis, *Maintaining and Troubleshooting HPLC System*, 2. Auflage im John Wiley and Sons, Canada, 1981
- [32] Ph.Eur., Europäisches Arzneibuch 6.4., *Kapitel 2.2.29, Flüssigkeitschromatographie*, 2009
- [33] Merck SOP: *Operational Qualification of the L-6200A Pump*, 1997
- [34] A.K. van der Vegt & L.E. Govaert, *Polymeren - van Keten tot Kunststof*, 5. Auflage im Delft University Press Verlag, Niederlande, 2005
- [35] L. R. Snyder and J. J. Kirkland, *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, 1. Auflage im KJ Press Verlag, Canada, 1979
- [36] G. Schwedt, *Analytische Chemie*, 1. Auflage im Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1995
- [37] Y. Kazakevich, R. Lobrutto, *HPLC for Pharmaceutical Scientists: Chapter 7. LC/MS: Theory, Instrumentation, and Applications to Small Molecules*, 1. Auflage im John Wiley and Sons Verlag, USA, 2006
- [38] J. Ohnesorge, *Quantitative Kapillarelektrophorese-Massenspektrometrie – Untersuchung der Präzision mittels verschiedener Interner Standards*, Dissertationschrift, Technische Universität Braunschweig, 2006
- [39] W. Schottky, *Über spontane Stromschwankungen in verschiedenen Elektrizitätsleitern*, Annalen der Physik 362, 541-567, 1918
- [40] S. Kromidas, *HPLC – Made to Measure*, 1. Auflage im Wiley-VCH Verlag, 2006
- [41] N. Magnell, *Chromatography for Bioanalytical Chemists*, LCGC Europe Volume 19, 5, 2006

-
- [42] Ph.Eur., Europäisches Arzneibuch 6.4., *Kapitel 2.2.46, Chromatographische Trennmethoden*, 2009
- [43] J. Dolan, *Enhancing Signal to Noise*, LCGC Europe, special issue, 2010
- [44] H. Wätzig, PZ Prisma, 9, 240–244, 2002
- [45] ICH, guideline Q2 (R1): *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*, 2005
- [46] USP, United States Pharmacopoeia 31 NF-26 S1 General Chapter <621> *Chromatography*, 2008
- [47] Ph.Eur., Europäisches Arzneibuch 6.4., *Kapitel 2.2.47, Kapillarelektrophorese*, 2009
- [48] Engineering Statistics Handbook, <http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/mpc/section1/mpc113.htm>
- [49] I. Halász et al., *Ultimate Limits in High-Pressure Liquid Chromatography*, J. Chrom., 112, 37–60, 1975
- [50] R. Brice et al., *Fused-core, sub-2 μ m packings, and monolithic HPLC columns: a comparative evaluation*, J. Sep. Sci., 32, 2723–2731, 2009
- [51] S. El Deeb, L. Preu, H. Wätzig, *A strategy to develop fast RP-HPLC methods using monolithic silica columns*, J. Sep. Sci., 30, 1993–2001, 2007
- [52] S. Lamotte et al., *Schnelle und effiziente Trennungen mit Hilfe von stationären Phasen auf der Basis von porösem Kieselgel mit Teilchendurchmessern von kleiner 2 μ m*, <http://www.chemie.de/articles/d/49907/>
- [53] J. M. Cunliffe, T. Maloney, *Fused-core particle technology as an alternative to sub-2- μ m particles to achieve high separation efficiency with low backpressure*, J. Sep. Sci., 30, 3104–3109, 2007
- [54] F. Gritti et al., *Comparison between the efficiencies of columns packed with fully and partially porous C18-bonded silica materials*, J. Chromatogr. A, 1157, 289–303, 2007
- [55] F. Gritti et al., *Comparative study of the performance of columns packed with several new fine silica particles: Would the external roughness of the particles affect column properties?*, J. Chromatogr. A, 1166, 30–46, 2007
- [56] F. Gritti et al., *Unusual behavior of the height equivalent to a theoretical plate of a new poroshell stationary phase at high temperatures*, J. Chromatogr. A, 1169, 125–138, 2007

-
- [57] K. Nakanishi, N. Soga, *Phase separation in gelling silica–organic polymer solution: systems containing poly(sodium styrenesulfonate)*, J. Am. Ceram. Soc., 74, 2518–2530, 1991
- [58] K. Nakanishi, N. Soga, *Phase separation in silica sol-gel system containing polyacrylic acid I. Gel formation behavior and effect of solvent composition*, J. Non Cryst. Solids, 139, 1–13, 14–24, 1992
- [59] K. Nakanishi, *Pore Structure Control of Silica Gels Based on Phase Separation*, 4, 2, 67–112, 1997
- [60] S. Pous-Torres et al., *Interpretive optimisation of organic solvent content and flow-rate in the separation of β -blockers with a Chromolith RP-18e column*, J. Sep. Sci. 32, 2793 – 2803, 2009
- [61] S. El Deeb, L. Preu, H. Wätzig, *Fast HPLC method for the determination of glimepiride, glibenclamide, and related substances using monolithic column and flow program*, J. Sep. Sci., 29, 1571 – 1577, 2006
- [62] A. M. van Nederkassel et al., *Fast separations on monolithic silica columns: method transfer, robustness and column ageing for some case studies*, J. Pharm. Biomed. Anal. 32, 233–249, 2003
- [63] R. P. W. Scott, C. G. Scott, P. Kucera, *Liquid-solid vacancy chromatography*, Anal. Chem. 44, 100–104, 1972
- [64] O. Abreu, G.D. Lawrence, *Analytical Reliability of Mobile-Phase Recycling in Liquid Chromatography*, Anal. Chem. 72, 1749–1753, 2000
- [65] S. Nygren, *Exponential Flow Programming in Gas Chromatography*, Journal of Chromatography, 142, 109–116, 1977
- [66] A. Schellinger, P. Carr, *Isocratic and gradient elution chromatography: A comparison in terms of speed, retention reproducibility and quantitation*, J. Chromatogr. A 1109, 253–266, 2006
- [67] P. Bedson, D. Rudd, *The development and application of guidance on EQ of analytical instruments: High performance liquid chromatography*, Accred Qual Assur 4, 50–62, 1999
- [68] S. Pous-Torres et al., *Origin and correction of the deviations in retention times at increasing flow rate with Chromolith columns*, J. Chromatogr. A 1217, 5440–5443, 2010
- [69] J. Foley et al., *Unavoidable Flow-Rate Errors in High-Performance Liquid Chromatography*, Journal of Chromatography, 478, 287–309, 1989

-
- [70] S. K. Bansal et al., *Qualification of Analytical Instruments for Use in the Pharmaceutical Industry: A Scientific Approach*, AAPS PharmSciTech 5, 1 Article 22, 1–8, 2004
- [71] USP, United States Pharmacopoeia 31 NF-26 S1 General Chapter <1225> *Validation of Compendial Methods*, 2008
- [72] V. Grisanti, E.J. Zachowski, *Operational and Performance Qualification*, LC-GC NA 20, 356–362, 2002
- [73] L. Huber, L. Welebob, *Selecting parameters and limits for equipment operational qualification*, Accred Qual Assur 2, 316–322, 1997
- [74] J. Crowther, J. Dowling, R. Hartwick, B. Ciccone, *Performance Qualification of HPLC Instrumentation in Regulated Laboratories*, LC-GC NA 26, 2008.
- [75] G. Hall, J.W. Dolan, *Performance Qualification of LC Systems*, LC-GC NA 20 842–848, 2002
- [76] P. Bedson, M. Sargent, *The development and application of guidance on equipment qualification of analytical instruments*, Accred Qual Assur 1, 265–275, 1996
- [77] European Commission, *EU Guide to Good Manufacturing Practice*, Annex 15 2001
- [78] K. Baumann, *Regression and calibration for analytical separation techniques. Part II: Validation, weighted and robust regression*, Process Contr. Qual. 10, 75–112, 1997
- [79] W. Furman et al., *Validation of Computerized Liquid Chromatographic Systems*, J. AOAC Int. 77, 1314–1318, 1994
- [80] Dionex SOP, *Operational Qualification*
- [81] Hellma Analytics, *Kalibrierstandards*, <http://www.hellma-analytics.com/text/272/de/holmiumoxidglas-filter-f1.html>
- [82] Merck SOP: *Operational Qualification of the DAD L-7450*, 1997
- [83] H. Auterhoff, K.A. Kovar, *Identifizierung von Arzneistoffen*, 1. Auflage im WVG, Stuttgart, 1998
- [84] K. Kumasaka, T. Kojima, H. Honda, K. Doi, *Screening and quantitative analysis for sulfonylurea-type antidiabetic agents in adulterated health food using TLC and HPLC*, J. Health Science 51, 453–460, 2005
- [85] D. Cabooter, F. Lynen, P. Sandra, G. Desmet, *Turbulence as a Source of Excessive Baseline Noise during High-Speed Isocratic and Gradient Separations Using Absorption Detection*, Anal. Chem. 80, 1679–1688, 2008
-

-
- [86] S. El Deeb, L. Preu, H. Wätzig, *Evaluation of monolithic HPLC columns for various pharmaceutical separations: Method transfer from conventional phases and batch to batch repeatability*, J. Pharm. Biomed. Anal. 44, 85–95, 2007
- [87] S. El Deeb, U. Schepers, H. Wätzig, *A strategy to develop fast RP-HPLC methods using monolithic silica columns*, J. Sep. Sci. 29, 1571–1577, 2006
- [88] VWR, *LiChroTest – PQ Testkit*, https://de.vwr.com/app/catalog/Catalog?parent_class_id=4&parent_class_cd=121111&frmls=x
- [89] EDQM, *Spezifikationen zur HPLC Gerätequalifizierung*, http://www.edqm.eu/medias/fichiers/Annex_1_Qualification_of_HPLC_Equipment.pdf
- [90] H. Wätzig, W. Mehnert, W. Bühler, *Mathematik und Statistik kompakt*, 1. Auflage im WVG, Stuttgart, 2009
- [91] U. Schepers, H. Wätzig, *Application of the equivalence test for analytical method transfers: Testing precision using the United States Pharmacopoeia concept <1010>*, J. Pharm. Biomed. Anal. 41, 290–292, 2006
- [92] U. Schepers, H. Wätzig, *Application of the equivalence test according to a concept for analytical method transfers from the International Society for Pharmaceutical Engineering (ISPE)*, J. Pharm. Biomed. Anal. 39, 310–314, 2005
- [93] ICH, guideline Q8 (R2): *Pharmaceutical Development*, 2009
- [94] ICH, guideline Q9: *Quality Risk Management*, 2005
- [95] D. Held, *How do I calibrate a GPC/SEC System?*, The Column 6, 18–21, 2008
- [96] Polymer Standard Services, <http://www.polymer.de>
- [97] J. Porath, P. Flodin, *Gel filtration: a method for desalting and group separation*, Nature 183, 1657–9, 1959
- [98] Ph.Eur., Europäisches Arzneibuch 6.4., *Monographien: Insulin Aspart*, 2009
- [99] Ph.Eur., Europäisches Arzneibuch 6.4., *Monographien: Erythropoetin*, 2009
- [100] Tosoh Biosciences, <http://www.separations.eu.tosohbioscience.com/>
- [101] Polymer Standard Services, *Bedienungsanleitung für GFC Säule*
-

- [102] IUPAC, *Glossary of Terms in Quantities and Units in Clinical Chemistry*, Pure Appl. Chem. 68, 4, 957–1000, 1996
- [103] D. Ejima et al., *Arginine as an effective additive in gel permeation chromatography*, J. Chromatogr. A 1094, 49–55, 2005
- [104] D. Ejima et al., *A method for improving recovery yield in protein purification with gel filtration chromatography using arginine*, European Patent Application, EP 1 698 637 A1, 2006
- [105] Ph.Eur., Europäisches Arzneibuch 6.4., *Kapitel 2.5.33, Gesamtprotein*, 2009
- [106] LCI – Köln, Lebensmittelchemisches Institut – Köln, *Vortäuschen höherer Eiweißgehalte: Grenzen der Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl*, Süßwaren 11, 1–2, 2008
- [107] Ph.Eur., Europäisches Arzneibuch 6.4., *Monographien: Diethylenglycol-palmitostearat*, 2009
- [108] J. Carpenter et al., *Potential Inaccurate Quantitation and Sizing of Protein Aggregates by Size Exclusion Chromatography: Essential Need to Use Orthogonal Methods to Assure the Quality of Therapeutic Protein Products*, J. Pharm Sci. 99, 5, 2200–2208, 2010
- [109] F. Hussein, *Untersuchung verschiedener Einflüsse auf die Proteinadsorption an Primärpackmitteln*, Dissertationschrift, Technischen Universität Braunschweig, 2007
- [110] N. Dyson, *Peak distortion, data sampling errors and the integrator in the measurement of very narrow chromatographic peaks*, J. Chromatogr. A 842, 321–340, 1999
- [111] J. Foley, *Systematic Errors In The Measurement Of Peak Area And Peak Height For Overlapping Peaks*, J. of Chromatography 384, 301–313, 1987
- [112] W. Kopaciewicz, F. E. Regnier, *Nonideal Size-Exclusion Chromatography of Proteins: Effects of pH at Low Ionic Strength*, Anal. Biochem. 126, 8–16, 1982

- [113] E. Rozet, W. Dewé, E. Ziemons, A. Bouklouze, B. Boulanger, Ph. Hubert, *Methodologies for the transfer of analytical methods: A review*, J. Chrom. A. 23, 2214–2223, 2009
- [114] CFR, *Code of Federal Regulations Chapter 21 §211*, 21CFR211.165, 2009
- [115] CFR, *Code of Federal Regulations Chapter 21 §211*, 21CFR211.194, 2009
- [116] Quattrochi et al., *Transfer of Analytical Procedures: A Proposal for a New General Information Chapter*, Pharm. Forum 35, 5, 1380–1382, 2009
- [117] E. Rozet, W. Dewé, R. Morello, P. Chiap, F. Lecomte, E. Ziemons, K.S. Boos, B. Boulanger, J. Crommen, Ph. Hubert, *Risk-based approach for the transfer of quantitative methods: Bioanalytical applications*, J. Chrom. A 1189, 32–41, 2008
- [118] M. Broughton, J. Ermer, in: J. Ermer, J.H.McB. Miller (Eds.), *Method validation in pharmaceutical analysis*, 1. Auflage im Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 281–300, 2005
- [119] M. Limberger, *Transfer of Analytical Methods*, <http://www.phast.de/Veroeffentlichungen>
- [120] H. Wätzig and J. Ermer, *Statistik in der Pharmazeutischen Analytik Teil 2: Unsicherheit über Unsicherheit*, PZ Prisma, 11, 4, 257–265, 2003
- [121] Hauck et al., *Acceptable, Equivalent or Better: Approaches for Alternatives to Official Compendial Procedures*, Pharm. Forum 35,3, 772–778, 2009
- [122] U. Schepers und H. Wätzig, *Statistische Signifikanz und Relevanz: Klassische t- und F-tests oder Äquivalenztest*, PZ Prisma 15, 3, 187–196, 2008
- [123] D.J. Schuirmann, *On hypothesis testing to determine if the mean of a normal distribution is contained in a known interval*, Biometrics 37, 617 1981
- [124] NOVIA GmbH, *MVA - Method Validation in Analytics*, <http://www.novia.de>
- [125] S. Wellek, *Statistische Methoden zum Nachweis von Äquivalenz*, 1. Auflage im Fischer Verlag, Stuttgart, 1994

- [126] G. de Fontenay, *Analytical method transfer: New descriptive approach for acceptance criteria definition*, J. Pharm. Biomed. Anal. 46, 104–112, 2008
- [127] U.Schepers et al., *Wide concentration range investigation of recovery, precision and error structure in liquid chromatography*, J. Chromatogr. B, 810, 211–213, 2004
- [128] British Pharmacopoeia, 5th Edition, Council of Europe, *Appendix I D A109*, 1999
- [129] UniProt, *Protein Database*, <http://www.uniprot.org>
- [130] Agilent Technologies, white paper: *Hidden Costs and Undiscovered Opportunities in AIQ*, 2007

10. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Lukas Michael Kaminski
Geburtsdatum: 02. April 1980
Geburtsort: Breslau (Wrocław), Polen
Familienstand: verheiratet
Staatsangehörigkeit: deutsch

Beruflicher Werdegang

seit März 2011 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für
Biologie und Chemie der Universität Hildesheim.

Nov. 2007 – Feb. 2011 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für
Pharmazeutische Chemie der Technischen
Universität Braunschweig.

10. Dezember 2007 Approbation als Apotheker.
Mai 2007 – Okt. 2007 zweiter Abschnitt der praktischen Ausbildung:
Institut für Pharmazeutische Chemie der
Technischen Universität Braunschweig.

Nov. 2006 – Apr. 2007 erster Abschnitt der praktischen Ausbildung:
Packhof-Apotheke in Braunschweig.
(Inh.: Apothekerin U. Friederike Jungherr)

Hochschulbildung

Okt. 2001 – Sep. 2006 Studium der Pharmazie an der Technischen
Universität Braunschweig.

Wehrdienst

Sep. 2000 – Jun. 2001 Grundwehrdienst beim 4./Stabs- und
Fernmeldebataillon 1. in Rotenburg an der Wümme

Schulbildung

Aug. 1993 – Jun. 2000 Gymnasium Martino Katharineum in Braunschweig
Sep. 1991 – Mai 1993 Orientierungsstufe Rothenburg in Braunschweig
Feb. 1988 – Jul. 1991 Grundschule am Lehmanager in Braunschweig
Aug. 1987 – Jan. 1988 Grundschule in Breslau